

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

Prävalenz der Progranulin-Autoantikörper bei seropositiver und seronegativer rheumatoider Arthritis

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Homburg/Saar 2017

vorgelegt von:
Moritz Gerling
geb. am 13.03.1986 in Hamburg

Erster Berichterstatter (Doktorvater): Prof. Dr. med. Gunter Aßmann

Für meine Großmutter Gisela Gerling

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Zusammenfassung	1
1.1 Prävalenz der Progranulin-Autoantikörper bei seropositiver und seronegativer rheumatoider Arthritis	1
1.2 Prevalence of progranulin autoantibodies in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis	3
2. Einleitung	5
2.1 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA).....	5
2.1.1 T-Zellen.....	6
2.1.2 B-Zellen	6
2.1.3 Unspezifisches Immunsystem	6
2.1.4 TNF α , Mediator und Therapieansatz	7
2.2 Autoantikörper bei Rheumatoider Arthritis	8
2.2.1 Rheumafaktor	8
2.2.2 Anti-CCP	9
2.2.3 Weitere Autoantikörper	10
2.3 Progranulin.....	12
2.4 Progranulin Antikörper.....	14
3. Material und Methodik.....	15
3.1 Materialien	15
3.1.1 Ethische Grundlagen	15
3.1.2 Patientenkollektiv.....	15
3.1.3 Laborgeräte	16
3.1.4 Labormaterialien.....	16
3.2 Methodik	18
3.2.1 Immunologische Testverfahren.....	18
3.2.2 Klassifikations- und Scoringsysteme	24
3.2.3 Aktenrecherche.....	29
3.2.4 Statistik.....	32
4. Ergebnisse	33
4.1 Fragestellung	33
4.2 Progranulin-Antikörper in der RA-Kohorte.....	34
4.3 Subgruppenverteilung des Progranulin Antikörpers	34
4.3.1 Progranulin Antikörper und Serostatus	34

4.3.2 Definition weiterer Subgruppen	36
4.3.3 Progranulin-Antikörper im Vergleich zu Geschlecht, Erosionen, RF sowie anti-CCP	36
4.3.4 Progranulin Antikörper im Vergleich zu Patientenalter, Krankheitsdauer, DAS 28 sowie HAQ	37
4.3.5 Patienten mit positivem Progranulin Antikörper Nachweis: Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4.4 Patienten unter TNF α -Inhibitor Therapie	38
4.4.1 Progranulin-Antikörper und TNF α -Inhibitor Therapieversagen	39
4.4.2 Univariate Analyse der RA-Patienten mit TNF α -Inhibitor Therapieversagen	39
4.4.3 Risikofaktoren für TNF α -Inhibitor Therapieversagen, multivariate statistische Analyse	40
4.4.4 Patienten unter TNF α -Inhibitor Therapie: Zusammenfassung der Ergebnisse	41
4.5 Beschreibung des Patientenkollektivs	42
4.5.1 Alter, Geschlecht und Beobachtungszeit	42
4.5.2 Rheumafaktor und Antikörper gegen das zyklisch citrullinierte Peptid.....	43
4.5.3 Progranulin Antikörper	43
4.5.4 TNF α -Inhibitor Therapie	44
4.5.5 Larsen Score	44
4.5.6 DAS28 Score	44
4.5.7 HAQ Score	44
4.5.8 Serum TNF α	44
4.5.9 Progranulin-Status	45
4.5.10 Serokonversion Progranulin-Antikörper und Progranulin-Status	45
5. Diskussion	47
5.1 Aussagekraft der vorliegenden Studie.....	47
5.2 Progranulin Antikörper und rheumatoide Arthritis	47
5.3 Progranulin Antikörper und serologischer Status	48
5.4 Progranulin Antikörper und Prognose der rheumatoiden Arthritis	49
5.5 Progranulin Antikörper und TNF α -Inhibitor Therapieversagen	51
5.6 Weitere Risikofaktoren für ein TNF α -Inhibitor Therapieversagen.....	52
5.7 Serum-TNF α	53
5.8 Progranulin als Therapieansatz für die rheumatoide Arthritis	54
5.9 Ausblick.....	54
6. Literaturverzeichnis.....	56
7. Danksagung	60
8. Publikationen	61

9. Lebenslauf (entfernt)

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
ANA	Antinucleäre Antikörper
Anti ENA	Antikörper gegen "extractable nuclear antigens"
Anti SS-A	Namensgebend für diesen Antikörper ist das Sjögren Syndrom, hier Ak Typ A
Anti SS-B	Namensgebend für diesen Antikörper ist das Sjögren Syndrom, hier Ak Typ B
Anti-CarP Ak	Antikörper gegen carbamylierte Proteine
Anti-CCP	Antikörper gegen das zyklisch citrullinierte Peptid
Anti-dsDNA	Antikörper gegen doppelsträngige DNA
Anti-Jo	Namensgebend für diesen AK ist der Patient John P.
Anti-PAD4	Anti-peptidylarginine deiminase 4 Antikörper
Anti-RNP	Antikörper gegen das ribonucleäre Protein
Anti-Scl-70	Antikörper gegen die Topoisomerase I
BiP	stress protein immunoglobulin heavy-chain binding protein
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CC	CC Chemokin-Familie zugehörig
CRD	Cysteinreiche Domäne
CRP	C-reaktives Protein
CXC	Der CXC Chemokin-Familie zugehörig
DKK-1	Dickkopf-1
DMARD	Disease-modifying antirheumatic drug / Basistherapeutika der RA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR3	Death Receptor 3
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League Against Rheumatism
GRN	Granulin
hnRNP-A2	nukleäres Ribonucleoprotein A2
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
MCP	Metacarpophalangeal
MTP	Metatarsophalangeal
OPD	O-Phenylen-Diamin
PGRN	Progranulin
PIP	Proximal Interphalangeal
POX	Peroxidase
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF-kB Ligand
RF	Rheumafaktor
rhPGRN	rekombinantes, humanes Progranulin
RIA	Radioimmunoassay
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFR	TNF α Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrosefaktor Alpha

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des indirekten ELISA; E: Enzym, Ab: Antikörper, Ag: Antigen, Bildausschnitt [26]	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sandwich- ELISA; E: Enzym, Ab: Antikörper, Ag: Antigen, Bildausschnitt [26]	20
Abbildung 3: Definition und Punktevergabekriterien der ACR/EULAR Klassifikationskriterien von 2010 [33]	25
Abbildung 4: Darstellung der 28 für den DAS28 relevanten Gelenke und deren Beurteilung, [35]	26
Abbildung 5: Beispielhafter Auszug der Items 1 bis 4 aus dem HAQ, [35].....	27
Abbildung 6: Detaillierte Einteilungskriterien des Larsen-Score in Stadium I bis V [35]	28
Abbildung 7: Darstellung der seropositiven und seronegativen Patientengruppen im Vergleich zum PGRN Ak Status, dabei farbliche Hervorhebung der seronegativen, aber PGRN positiven Subgruppen [21]	35
Abbildung 8: : Darstellung der PGRN Ak-Verteilung in den Subgruppen männliche- und weibliches Geschlecht, Larsen ≥ 2 , Erosionen +, RF + und anti-CCP + im Vergleich zur Gesamtverteilung.....	37
Abbildung 9: Darstellung von TNF α -Inhibitor Versagen in Betrachtung zu den jeweiligen Subgruppen	41
Abbildung 10: Darstellung des Patientenalters im Boxplot.....	42
Abbildung 11: Darstellung der Beobachtungszeit im Boxplot.....	43
Abbildung 12: Vergleich des PGRN Ak-Status mit dem Auftreten von erhöhten Serum TNF α -Spiegeln. Unterschiede nicht signifikant ($p=0.4$, Fischer Test).....	45
Abbildung 13: Darstellung der Gesamtverteilung erhobener Patientencharakteristika	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verschiedene Autoantikörper bei RA in verschiedenen Patientenkohorten mit Angabe der Prävalenz	8
Tabelle 2: Laborgeräte	16
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 4: Antikörper	17
Tabelle 5: Lösungen	17
Tabelle 6: Erläuterungen zu den Parametern der Aktenrecherche	31
Tabelle 7: Alter, Krankheitsdauer, DAS28 und HAQ in Relation zum PGRN Ak Status, * = Odds Ratio, Konfidenzintervall ($P < 0,05$), ** = nicht signifikant	38
Tabelle 8: Darstellung von TNF α -Inhibitor Versagen in Betrachtung zu den jeweiligen Subgruppen	40
Tabelle 9: Multivariate statistische Analyse, unabhängige Variablen für TNF α -Inhibitor Therapieversagen	42
Tabelle 10: Autoimmunerkrankungen mit Nachweis von PGRN Ak in der Literatur .	48
Tabelle 11: Relevanz von RF, anti-CCP und DAS 28 bezüglich einer TNF α -i Therapie im Literaturvergleich, * = Daten dieser Studie, univariat, ** = Daten dieser Studie, multivariat	53

1. Zusammenfassung

1.1 Prävalenz der Progranulin-Autoantikörper bei seropositiver und seronegativer rheumatoider Arthritis

In dieser Studie wurde eine repräsentative Kohorte von Patienten mit rheumatoider Arthritis auf Serum Progranulin-Antikörper untersucht und ausführlich charakterisiert. Dabei fokussiert die Arbeit zum einen die Bestimmung der Prävalenz jener Autoantikörper und zum anderen eventuelle Korrelationen mit Serostatus, Krankheitsverlauf und Krankheitsaktivität. Während für den Rheumafaktor und die anti-CCP eine prognostische Relevanz bekannt ist, wurde der Progranulin-Antikörper in Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis bisher kaum beleuchtet.

Im Zeitraum von November 2011 bis März 2014 wurden Seren von insgesamt $n = 317$ Patienten sowohl aus der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik des Saarlandes als auch der rheumatologischen Praxis in Berlin-Lichtenberg (Fr. Dr. Zinke) gesammelt. Der Progranulin-Antikörperstatus wurde mittels standardisiertem ELISA ermittelt; durch retrospektive Aktenanalyse wurden Krankheitsaktivität (Erosionen, Larsen Score, DAS28 Score, Health Assessment Questionnaire), Krankheitsdauer, Serostatus (Rheumafaktor und anti-CCP), Therapieregime (Basistherapie und TNF α Inhibition), Alter und Geschlecht dokumentiert. Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Student's t -test, des χ^2 test sowie in Einzelfällen der multivariaten logistischen Regressionsanalyse.

Die Ergebnisse unserer Auswertung zeigen eine Prävalenz des Progranulin-Antikörpers von 26.6 % (81 von 305). Die Subgruppenanalyse zeigt ein überproportionales Auftreten in den Gruppen „männliches Geschlecht“ (31.1%; $p=0.001$), „erosiver Verlauf“ (28.4%; $p=0.026$) und „positiver Rheumafaktor“ (28.0%; $p=0.001$); auch ein höherer DAS28 Score ist statistisch signifikant mit einem Progranulin-Antikörnernachweis verknüpft (DAS 28: 3.48 vs. 3.87; $p=0.041$). Ein Vergleich mit dem Serostatus (Rheumafaktor und anti-CCP) zeigt, dass 26.8% (11 von 41) der Patienten mit seronegativer rheumatoider Arthritis einen positiven Progranulin Antikörper aufweisen. Bezogen auf eine Therapie mit TNF α -Inhibitoren korrelieren in der univariaten Analyse ein positiver Progranulin-Antikörper, ein erosiver Verlauf, ein DAS28 ≥ 3.2 , positive Rheumafaktoren, positive anti-CCP sowie positives Serum

TNF α mit einem TNF α -Inhibitor Therapieversagen. Von den letztgenannten Faktoren werden in der Regressionsanalyse ein DAS 28 \geq 3.2, eine erosive Gelenkbeteiligung sowie positive anti-CCP als statistisch signifikante und unabhängige Parameter evaluiert, welche häufiger bei Patienten mit Therapieversagen unter TNF α -Inhibitoren auftreten. Das vorliegende Studiendesign erlaubt allerdings keine Aussagen zum prädiktiven Wert der Progranulin-Antikörper hinsichtlich Therapieversagen.

Die vorliegenden Daten legen zum einen nahe, dass Progranulin-Antikörper bei seronegativen Patienten (Rheumafaktor sowie anti-CCP negativ) diagnostische Bedeutung haben können und zeigen zudem eine höhere Prävalenz bei Patienten mit schlechter Prognose (DAS28 \geq 3.2, positiver Rheumafaktor, erosiver Verlauf und TNF α -Inhibitor Therapieversagen). Weitere Studien mit höheren Fallzahlen und prospektivem Studiendesign wären wünschenswert, um die vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen und die prognostische Relevanz der Progranulin-Antikörper bei rheumatoider Arthritis zu untersuchen.

1.2 Prevalence of progranulin autoantibodies in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis

In this study a representative cohort of patients with rheumatoid arthritis was tested for progranulin antibodies and characterised in detail. The focus of this work is to establish the prevalence of progranulin antibodies and its possible correlations with serostatus, course of disease and disease activity. While prognostic relevance has been proven for rheumatoid factor and anti-CCP, little is known about the relation between progranulin antibodies and rheumatoid arthritis.

Sera from n = 317 patients were collected from november 2011 to march 2014 at Saarland University medical center (department for rheumatology) and at the rheumatologic practice in Berlin-Lichtenberg (Dr. Zinke). The progranulin antibody-status was determined with standartised ELISA while disease activity (erosion, Larsen score, DAS28 score and health assessemtn questionnaire), disease duration, serostatus (rheumatoid factor and anti-CCP), therapy regime (basis therapy and TNF α -inhibition), age and sex were documented through retrospective record analysis. Statistic evaluation was conducted by student's t-test, χ^2 test and in particular cases by multivariate logistic regression analysis.

Our results show a prevalence for progranulin antibodies of 26.6% in total (81 of 305). Subgroup analysis indicates higher occurrence in the following groups: male sex (31.1%; p=0.001), erosive course of disease (28.4%; p=0.026) and higher DAS28 score (DAS28: 3.48 vs. 3.87; p=0.041). Compared to serostatus (rheumatoid factor and anti-CCP) 26.8% (11 of 41) of the patients with seronegative rheumatoid arthritis show a positive progranulin antibody. Referring to TNF α -inhibitor therapy, positive progranulin antibodies, erosive disease, DAS28 \geq 3.2, positive rheumatoid factor, positive anti-CCP and positive serum-TNF α correlate with higher development of TNF α -inhibitor failure in univariate analysis. In multivariate logistic regression-analysis a DAS28 \geq 3.2, erosive disease and positive anti-CCP were confirmed as independent parameters for a higher probability of TNF α -inhibitor failure. The present study design does not allow us to establish a predictive value for progranulin antibodies regarding TNF α -inhibitor failure.

The study on hand shows that progranulin antibodies could have diagnostic relevance for seronegative (rheumatoid factor and anti-CCP negative) patients and indicates higher prevalence of progranulin antibodies for patients with poor prognosis (DAS28 \geq 3.2, positive rheumatoid factor, erosive course of disease and TNF α -inhibitor failure). Further studies with a larger number of patients and prospective study-design are required to confirm our findings and to prove the prognostic relevance of progranulin antibodies.

2. Einleitung

Die Rheumatoide Arthritis, früher „primär chronische Polyarthritis“ genannt, ist eine progressive Systemerkrankung des rheumatischen Formenkreises autoimmuner Genese, welche mit regionalen Unterschieden weltweit etwa 0.5-1 % der erwachsenen Bevölkerung betrifft [17]. Es handelt sich um die häufigste chronisch entzündliche Gelenkerkrankung; zentrale Prozesse sind eine synoviale Inflammation, eine Antikörperproduktion sowie eine kartilaginäre und ossäre Destruktion. Bevorzugt tritt die RA im Alter zwischen 55 und 75 Jahren auf, dabei sind Frauen deutlich häufiger betroffen als Männer (Verhältnis 2-3 [Frauen] : 1 [Männer]; [17]). Ein fortschreitender, chronischer Verlauf ist typisch und neben der Arthritis sind viszerale Manifestationen sowie systemische Beteiligungen im Sinne von kardiovaskulären, pulmonalen, psychologischen und ossären Komorbiditäten möglich [42]. Die Ätiologie der Erkrankung ist nach wie vor ungeklärt, jedoch sind Einflüsse intrinsischer Art (genetische Prädisposition) und extrinsischer Art (Umweltfaktoren) hinlänglich bekannt. Eine frühe Diagnosestellung und der darauffolgende unmittelbare Therapiebeginn sind für den Krankheitsverlauf entscheidend und unterstreichen den Stellenwert der vorliegenden Arbeit, welche zu einem Erkenntnisgewinn in Hinblick auf aussagekräftige Diagnosemarker beitragen soll.

2.1 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA)

Neben hereditären Faktoren wie der Beteiligung der Gene HLA-DRB1*04, A1-B8-DR3, HLA-DPB1, PTPN22, PADI4, STAT4, TRAF1-C5 und TNFAIP3 [12] sowie externen Einflüssen wie der beispielsweise von Choy et. al. beschriebenen Assoziation mit Nikotinkonsum und Infektionen [12] beruhen die zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen dem spezifischen und unspezifischen Immunsystem und zwar vor allem auf der Beteiligung von T-Zellen, B-Zellen, Zytokinen und Makrophagen.

2.1.1 T-Zellen

CD4+ T-Zellen werden aktiviert durch antigenpräsentierende Zellen. Dabei erfolgt eine Stimulation durch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) und die zugehörige Interaktion mit dem T-Zell Rezeptor (TZR), dem Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Peptid-Antigen sowie durch Kostimulation etwa durch den CD28-CD80/86 Signalweg [17]. CD4+ T-Zellen aktivieren zum einen B-Zellen, differenzieren aber auch zu Typ 1- und Typ 17-Helferzellen. Vor allem Typ 17-Helferzellen scheinen über die Ausschüttung von Interleukin 17 A, 17 B, 21, 22 sowie TNF α entscheidend zur Pathogenese der RA beizutragen [42]. T-Effektorzellen stimulieren zudem die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF α durch synoviale Makrophagen und Fibroblasten [17]. Therapeutisch setzen Ciclosporin und Abatacept an den T-Zellen an [17]

2.1.2 B-Zellen

Die B-Zellen, welche wie oben beschrieben durch CD4+ T-Zellen, aber auch durch APRIL (a proliferation inducing ligand), BLyS (B-lymphocyte stimulator) sowie CC- und CXC-Chemokine [42] aktiviert werden können, spielen im aktivierten Zustand und in Form der daraus entstehenden Plasmazellen eine weitere wesentliche Rolle im chronisch entzündlichen Prozess der rheumatoiden Arthritis [17]. Plasmazellen sind in der Lage, Autoantikörper wie RF und anti-CCP zu produzieren und es wird vermutet, dass letztere im Gelenk Immunkomplexe entstehen lassen, welche das Komplementsystem aktivieren und so die Entzündungsreaktion verstärken [17]. Die Pathogenität von CD20+ B-Zellen wird durch die therapeutische Effektivität von Rituximab (ein monoklonaler CD20-Antikörper) bestätigt; gleichzeitig legt die fehlende Wirksamkeit jener Antikörper an Plasmazellen nahe, dass es weitere, über die Antikörperproduktion hinausgehende, pathogenetische Mechanismen der B-Zell-Beteiligung gibt, welche Autoantigenpräsentation sowie Zytokinbildung einschließen [42].

2.1.3 Unspezifisches Immunsystem

Neben Makrophagen, Mastzellen und natürlichen Killerzellen, welche in der Synovialmembran gefunden werden können, befinden sich neutrophile Zellen vor allem in der Synovialis [42]. Angeregt werden diese Zellen von CSF (colony stimulating

factor), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), dabei wandern entsprechende Zellen aus dem Knochenmark in das Synovium ein [42]. Die Makrophagen, welche die Zytokine TNF α , IL-1, -6, -12, -15, -18 und -23 sowie weitere Botenstoffe ausschütten und Antigene präsentieren, sind zentrale Auslöser der Synovitis und werden ihrerseits durch T-like Rezeptoren (TLR), Nucleotid-bindende Oligomerisations Domäne-like Rezeptoren (NOD-like Rezeptoren) sowie durch T-Zell Interaktion, Zytokine und Immunkomplexe aktiviert [42]. Auch neutrophile Zellen begünstigen durch Bildung von Prostaglandinen, Proteasen und Sauerstoffintermediäre die Synovitis; Mastzellen verstärken letztere mit Bildung von Zytokinen, Chemokinen sowie TLR- und Fc Rezeptor Interaktion [42].

2.1.4 TNF α , Mediator und Therapieansatz

TNF α ist vor allem in der Pathobiologie der Synovitis ein zentrales, pro-inflammatorisches Zytokin. Neben anderen Zellgattungen sind Monozyten und Gewebsmakrophagen - zumindest während der Inflammation - Hauptsyntheseorte für TNF α ; dabei wird die zugehörige Genexpression von diversen biologischen, chemischen und physikalischen Reizen wie z.B. Cytokinen (IL-1b, IL-2, Interferon- γ), Tumorzellen und Erregerbestandteilen stimuliert [47].

Funktionell werden durch TNF α -Adhäsionsmoleküle der Epithelzellen hochreguliert, der Einstrom von Leukozyten in die Synovialis verstärkt, die Angiogenese gefördert, synoviale Fibroblasten aktiviert (und auf diese Weise die Produktion von Gelenkknorpel abbauenden Matrixmetalloproteinase gesteigert), Schmerzrezeptoren sensibilisiert und die Osteoklastengengese über verstärkte RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) Expression verstärkt [17]. TNF α fördert jedoch nicht nur den Knochenverlust, sondern supprimiert durch eine Steigerung der Expression von DKK-1 (Dickkopf-1) auch die Knochenneubildung [17]. DKK-1 entfaltet seine Wirkung über die Inhibition des Wnt-Signalwegs, welcher seinerseits die Differenzierung von Osteoblasten und damit die Knochenneubildung steuert [17]. Die Inflammation und vor allem die RA betreffend verstärkt sezerniertes TNF α zudem die Antwort der Th1-Zellen, steigert die Genexpression von IL-1 direkt, sowie jene von IL-1, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, Interferon- γ und weiteren Botenstoffen indirekt [47].

Die bedeutsame Rolle von TNF α in der Pathogenese der RA wird anhand des erfolgreichen Einsatzes von TNF α Inhibitoren in der Behandlung der therapierefraktären RA bestätigt.

Für die Therapie der RA stehen derzeit fünf TNF α Inhibitoren zur Verfügung: Infliximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper; Adalimumab und Golimumab sind humanisierte monoklonale Antikörper; Certolizumab ist ein pegyliertes, Fc-freies Fragment eines humanisierten monoklonalen Antikörpers und Etanercept ist ein löslicher Antikörper, welcher aus einem Fusionsprotein des TNF α Rezeptor 2, kovalent gebunden an den Fc-Anteil von IgG1, besteht.

2.2 Autoantikörper bei Rheumatoider Arthritis

Autoantikörper	Prävalenz bei RA
Rheumafaktor IgM	75 - 80% [17]
Anti-CCP	71.7 % [59]
Anti-BiP	~ 60% [50]
ANA	20 - 40% [22]
Anti-peptidylarginine Deiminase 4	23 - 42% [14]
Anti-Sa	~ 40 % [50]
Anti-A2/anti-RA33	~ 33% [50]
Anti-BRAF	~ 30% [4]
Anti-CarP	16 – 73 % [49]

Tabelle 1: Verschiedene Autoantikörper bei RA in verschiedenen Patientenkohorten mit Angabe der Prävalenz

2.2.1 Rheumafaktor

Im Jahr 1939 beschrieben Waaler et. al. erstmals einen Faktor, der sich in Seren von Patienten mit RA nachweisen ließ und welcher zur spezifischen Agglutination von korpuskulären Bestandteilen im Schafblut führte [61]. Jener Faktor, später als Rheumafaktor (RF) bekannt, wurde im Jahre 1988 erstmals in die damaligen ACR

Kriterien aufgenommen [8] und war damit der erste für die Diagnose der RA relevante Autoantikörper.

Der gegen das Fc Fragment des IgG gerichtete RF lässt sich in die Subklassen IgM, IgG und IgA einteilen. Der IgM Typ ist dabei weltweit am gebräuchlichsten und lässt sich bei 75 – 80% der RA Patienten nachweisen [17]. Allerdings kann der RF auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen wie z.B. dem Sjögren Syndrom (~70%), dem systemischen Lupus Erythematosus (~30%), der progressiven Sklerodermie (~20%) und auch bei einer Reihe von infektiösen Erkrankungen wie z.B. der infektiösen Endokarditis (~40%), der Hepatitis A/B/C (~25%) oder der Tuberkulose erhöht sein [33]. Sogar bei gesunden Probanden lässt sich der RF nachweisen, in höherem Lebensalter ist der Nachweis bei bis zu 20% möglich [1]. Damit liegt die Spezifität bei nur 85% und ist damit deutlich geringer als die des anti-CCP (Spezifität: 94 – 99%), während die beiden Marker sich bezüglich der Sensitivität wenig unterscheiden (69% für den RF und 61.4 - 67% für die anti-CCP) [1],[33].

2.2.2 Anti-CCP

Die Entdeckung von Antikörpern, welche gegen citrullinhaltige, zyklische Peptide gerichtet sind (Anti-CCP), geht auf Arbeiten zum anti-perinucleären Faktor von Niehuis et. al. aus dem Jahre 1964 zurück [43]. Grundlegend für das Verständnis jener Antikörper ist der im Rahmen der Pathogenese der RA beschriebene Vorgang der Citrullinierung. Dabei handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, bei welchem durch Peptidylarginin – Deiminase (PAD) Enzyme die post-translationale Modifikation von Arginin zu Citrullin katalysiert wird [52]. Jener Prozess, welcher der Epithel-Keratinisierung, der Inflammation und der gesteigerten Apoptose zugrunde liegt, wurde bisher vor allem für Filaggrin, Fibrin und Vimentin beschrieben und bildet die Grundlage für die Autoantikörperreaktion [52].

Bei der Entwicklung eines standardisierten Verfahrens zum Nachweis jener Antikörper stellte sich heraus, dass ein Assay, welches Autoantikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide (CCP) detektierte, am besten reproduzierbar war, sodass man heute für die Bestimmung des anti-CCP in aller Regel den anti-CCP2 oder -3 ELISA verwendet [46], [59].

Anti-CCP werden in erster Linie mit der RA in Verbindung gebracht. Mit kumulativen Daten von 164 Studien und über 18.000 Patienten errechneten Aggarwal et. al. eine Sensitivität von 61.4% und eine Spezifität von 94 - 99% der anti-CCP für die RA [1], Trouw et. al errechneten ebenfalls aus kumulativen Daten eine Prävalenz von 71.7% [59]. Mehrere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die anti-CCP schon bis zu 10 Jahre vor Krankheitsbeginn nachgewiesen werden können und außerdem mit hoher Krankheitsaktivität sowie radiologischer Aktivität assoziiert sind [44], [59]. Nur in geringem Umfang werden diese Autoantikörper auch bei ischämischer Kardiomyopathie sowie B-Zell-Lymphomen nachgewiesen [3].

Aufgrund dieser im Vergleich zu den RF deutlich besseren Eigenschaften vor allem bezüglich des Diagnosezeitpunktes und der Spezifität haben anti-CCP aktuell den höchsten Stellenwert in der laborchemischen Diagnostik bei RA und wurden im Jahr 2010 in die aktuellen ACR/EULAR Kriterien aufgenommen.

2.2.3 Weitere Autoantikörper

Neben den für die Diagnose relevanten Autoantikörpern gibt es weitere, klinisch weniger bedeutsame Autoantikörper.

Anti-A2/anti-RA33 Antikörper:

Die Anti-A2/anti-RA33 Antikörper, welche bei etwa einem Drittel der RA Patienten nachweisbar sind, haben eine geringe Sensitivität von etwa 40% und können auch beim systemischen Lupus Erythematosus sowie bei der „mixed connective tissue disease“ (MCTD) nachgewiesen werden, sind bei anderen Arthritiden wie der Osteoarthritis, der reaktiven Arthritis sowie der Psoriasis Arthritis in der Regel aber nicht vorhanden und treten schon in frühen Stadien der RA auf [50]. Sie sind gegen das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein A2 (hnRNP-A2) gerichtet und spielen beim mRNA- Splicing und –Transport eine Rolle [50].

Antinucleäre Antikörper

Antinucleäre Antikörper repräsentieren eine Gruppe von Antikörpern, welche gegen Strukturen des Nucleus oder des Cytoplasmas gerichtet sind [48]. Sie werden vor allem mit Erkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematosus (v.a. Antikörper gegen doppelsträngige DNA (Anti-dsDNA, bei etwa 60%) und Anti-SM Ak)) dem Sjögren Syndrom (v.a. Anti-SS-A (beim primären Sjögren Syndrom bei etwa 60%) und Anti-SS-B), der systemischen Sklerose (v.a. Anti-Scl-70 Antikörper, in 20-25% der Fälle) und Polymyositis (v.a. Anti-Jo Ak, bei aggressivem Verlauf in 20-40% der Fälle) in Verbindung gebracht [48]. Auch ENA Ak (Antikörper gegen „extractable nuclear antigens“), Anti-Nucleoläre Antikörper, Anti-Centromere Antikörper und Anti-RNP (Antikörper gegen das ribonucleäre Protein) gehören in diese Antikörperklasse. Bei RA werden in etwa 20 – 40% der Fälle, v.a. bei hoher Aktivität mit viszeraler extraartikulärer Manifestation, ANA gefunden [22]. Dabei treten Anti SS-A Antikörper besonders bei zusätzlichem sekundärem Sjögren Syndrom auf und Anti-dsDNA vor allem im Verlauf einer Infliximab Therapie (besonders IgM) [50].

Anti-peptidylarginine deiminase 4 Antikörper:

Diese in der Kurzform als anti-PAD4 bezeichneten Antikörper sind gegen das Enzym Peptidylarginin-Deiminase 4 gerichtet und bei 23 – 42% der Patienten mit RA nachweisbar [14]. Eine positive Korrelation zwischen anti-PAD4 sowie anti-CCP und der Schwere des Krankheitsverlaufs wird beschrieben und auch eine gewisse Spezifität und die Möglichkeit einer pathogenetischen Bedeutung werden diskutiert [14].

Anti-Sa Antikörper:

Diese gegen ein 50 kDa schweres, aus menschlichem Gewebe isoliertem (unter anderem Synovia), aber bezüglich Struktur und Funktion unbekanntem Protein gerichteten Antikörper können bei etwa 40% der Patienten mit RA nachgewiesen werden [50]. Jene Autoantikörper werden selten in frühen Krankheitsstadien entdeckt, jedoch werden sie mit schweren Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht und weisen eine Spezifität von 92 – 98% auf [50].

Anti-BiP Antikörper:

Diese Autoantikörper sind gegen ein 68 kDa schweres und ubiquitäres Protein gerichtet, welches als „stress protein immunoglobulin heavy-chain binding protein“

(BiP) identifiziert wurde und auch unter dem Namen grp78 als Mitglied der 70 kDa Hitzeschock Proteinfamilie bekannt ist [50]. Diese Antikörper sind bei mehr als 60% der Patienten mit RA nachweisbar und werden vermehrt in Synovialgewebe exprimiert; die Spezifität wird mit 96% beziffert [50].

Anti-CarP Antikörper

In der Pathogenese der RA, zu einem geringen Anteil bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung oder kardiovaskulärer Erkrankung findet eine Carbamylation statt, ein Vorgang, welcher eine nicht-enzymatische, posttranslationale Modifikation von Proteinen beschreibt, bei welcher Cyanat an primäre Amino- oder Thiolgruppen bindet und welche in der Folge Bindungseigenschaften zu Liganden und Rezeptoren verändert [49]. In Hinblick auf die RA haben die Anti-CarP Ak (Antikörper gegen carbamylierte Proteine) eine Prävalenz von 16 – 73 % (anti-CCP Status negativ: IgG 16%, IgA 30%; anti-CCP Status positive: IgG 73%, IgA 51%), sind mit schwerem Gelenkschaden assoziiert und können ebenfalls bei etwa 40% der Patienten mit Arthralgien nachgewiesen werden [49].

Anti-BRAF Antikörper

BRAF (V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1) kodiert für eine Serin-Threonin-Kinase und ist über diesen Zusammenhang an der Regulation und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt; die dagegen gerichteten Antikörper führen zu einer Aktivierung o.g. Kinase [4]. Auger et. al. gibt für die RA eine Prävalenz von etwa 30% an, dabei sind 30% der anti-CCP negativen Patienten laut jener Studie Anti-BRAF positiv und 33% der Anti-BRAF positiven Patienten anti-CCP negativ [4].

2.3 Progranulin

Progranulin (PGRN) ist ein Glykoprotein aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren, welches auch unter den Namen “Granulin-Epithelin Precursor”, “Proepithelin”, “PC cell derived growth factor” oder “Acrogranin” geführt wird [23]. PGRN hat ein Molekulargewicht von 88 kDa [58] und besteht aus sieben Granulin (GRN) Motiven,

welche wiederum aus 12 durch Disulfidbindungen verknüpften Cysteinen bestehen [7]. Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF, VEGF oder FGF ist über PGRN noch relativ wenig bekannt [23]; bisher wird das Molekül mit der frühen Embryogenese [16], der Neurodegeneration [6], der Wundheilung [24], der Inflammation [32], der Tumorgenese [7, 23] sowie mit Zellproliferation, -überleben und -migration in Verbindung gebracht [24]. PGRN wird exprimiert in sich schnell teilenden Epithelzellen, Zellen des Immunsystems, Neuronen, Chondrozyten und in menschlichen Tumorzellen [39].

Während beispielsweise die Verknüpfung zur frontotemporalen Demenz, welche durch eine Mutation des PGRN-kodierenden Gens bedingt ist, weitestgehend verstanden wird [15], ist die Rolle des PGRN in Bezug zur RA noch nicht zweifelsfrei geklärt.

Tang et. al. konnten in einer Arbeit nachweisen, dass rekombinant hergestelltes, humanes PGRN (rhPGRN) an die TNF Rezeptoren 1 und -2 (TNFR1 und -2) bindet und auf diesem Weg die pro-inflammatorische Wirkung von TNF α , einem Mediator mit beträchtlicher Relevanz für die Pathogenese der RA, im Sinne eines physiologischen Antagonismus inhibiert [53]. Dabei beschreiben Tang et. al. eine im Vergleich zu TNF α höhere Bindungsaffinität von rhPGRN vor allem zu TNFR2. In Versuchen konnten sie weiterhin zeigen, dass GRN (-/-) Knockout Mäuse im Vergleich zu Kontrollen schwerere inflammatorische Arthritis sowie stärkere Knorpel- und Knochendestruktionen entwickelten [53]. Nachdem bei den GRN (-/-) Mäusen die Applikation von rhPGRN stattgefunden hatte, kam es zu einem Stillstand der Krankheitsprogression sowie einer Hemmung von Synovitis, Pannusformation, Gewebszerstörung und dem Verlust von Knorpelmatrix [53]. Darauf aufbauend wird auch ein möglicher Therapieansatz mittels PGRN und ATSTTRIN, einem aus mehreren PGRN Fragmenten zusammengesetzten Molekül, diskutiert.

Die Interaktion von ATSTTRIN findet dabei nach Liu et. al. nicht wie bei PGRN vornehmlich an TNFR 1 und -2 statt, sondern an einem weiteren Rezeptor der TNF Rezeptorfamilie, dem „Death Receptor 3“ (DR3) oder TNFRSF25 [38]. Dabei wird dosisabhängig der bisher einzig bekannte Ligand für DR3, der „TNF-like ligand 1A“ (TL1A) und die damit verknüpfte Genexpression inhibiert [38]. Tang et. al. konnten zeigen, dass beide Substanzen zu einem Rückgang von Inflammation und Knochen- sowie Knorpeldestruktionen führten und die Wirkung von ATSTTRIN dabei stärker als die von PGRN war [53].

Weitere Arbeiten zeigen eine erhöhte Konzentration von Serum PGRN bei Patienten mit RA [64], eine vermehrte Expression von PGRN in Synovia und Synovialgewebe bei Patienten mit RA sowie eine Korrelation von zirkulierendem PGRN und Krankheitsaktivität (jeweils höhere DAS28 und HAQ Scores) bei Patienten mit RA [11], wobei in diesen Studien die Pathogenese bzw. Prävalenz von AK gegen PGRN nicht untersucht wurden.

2.4 Progranulin Antikörper

Progranulin Antikörper gehören in die Gruppe der Autoantikörper und konnten bereits bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. Bisher wurden sie beschrieben bei primären Vaskulitiden und SLE [55], M. Crohn und Colitis Ulzerosa [56] sowie bei Psoriasis Arthritis [57] und RA (PGRN Ak bei 16 von 44 Patienten; 36% [55]). Gleichzeitig scheint die Prävalenz bei gesunden Probanden äußerst gering (1 von 97 Patienten; 1% [55]).

In einer weiteren Arbeit beobachteten Thurner et. al. einen geringeren PGRN Spiegel bei Patienten mit positivem PGRN Ak-Nachweis und gehen folglich von einem Neutralisationseffekt aus, welcher hypothetisch einen pro-inflammatorischen Effekt zur Folge haben könnte [55].

Sie beschreiben ebenfalls das Phänomen der Hyperphosphorylierung durch die Kinase PKC β 1 und die Phosphatase PP1 von PGRN an Position Ser81 [54]. Dieser Vorgang sowie das entsprechende Produkt wurden von ihnen nur bei PGRN Ak-positiven Probanden beobachtet und vermindert die Interaktion von PGRN an TNFR1, TNFR2 und DR3, sodass die pro-inflammatorische Wirkung der PGRN Ak durch diesen Prozess zusätzlich verstärkt wird [54].

3. Material und Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Ethische Grundlagen

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Nr. 242/11) und entsprechend den Richtlinien der Erklärung von Helsinki durchgeführt.

3.1.2 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Patientendaten und zugehörige Proben von insgesamt 317 Patienten sowohl aus der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar ($n = 217$) als auch aus der rheumatologischen Praxis in Berlin–Lichtenberg (Fr. Dr. Zinke, $n = 100$) untersucht. Bei allen Patienten lag die Diagnosestellung „Rheumatoide Arthritis“ durch einen Facharzt vor. Grundlegend dafür waren für Patienten mit Diagnosestellung vor 2010 die ARA Kriterien von 1987 sowie für Patienten mit Diagnosestellung ab 2010 die ACR/EULAR Kriterien von 2010. Patienten ab 18 Jahren wurden in die Studie eingeschlossen. Die Auswahl der Patienten und die Auswertung der Serumproben fanden im Zeitraum zwischen November 2011 und März 2014 statt. Die Proben wurden im Rahmen von diagnostischen Blutentnahmen gewonnen und zur weiteren Verwendung im José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie Homburg/Saar verwahrt. Die Entnahmen waren bei der Mehrheit der Patienten nur zu einem Zeitpunkt möglich ($n = 205$), jedoch konnten in einem Teil der Fälle ($n = 100$) auch im Krankheitsverlauf Messungen erfolgen.

3.1.3 Laborgeräte

Gerät	Bezugsquelle
Gefrierschrank -20° C	Liebherr, Stuttgart (DE)
Gefrierschrank -80° C	Nunc, Wiesbaden (DE)
Kühlschrank 4° C	Bosch, Stuttgart (DE)
Pipetten (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Victor 2 1420 Multilabel Counter (ELISA)	Wallac, Freiburg (DE)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (DE)

Tabelle 2: Laborgeräte

3.1.4 Labormaterialien

3.1.4.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Aqua dest.	Merck, Darmstadt (DE)
Dinatriumphosphat	Merck, Darmstadt (DE)
ELISA-Platte, 96-Well (NUNC Maxisorp F)	Nunc, Langensebold (DE)
Gelatine	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt (DE)
OPD	Sigma, St.Louis (USA)
Salzsäure	Merck, Darmstadt (DE)
Streptavidin Peroxidase	Roche, Mannheim (DE)
TRIS	Roth, Karlsruhe (DE)
TRISZMA Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Merck, Darmstadt (DE)
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt (DE)
Zitronensäure	Merck, Darmstadt (DE)

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

3.1.4.2 Antikörper

Material	Bezugsquelle
Spez. Ak gegen hyperphosphoryliertes GRN	<i>Im Labor rekombinant hergestellt</i>
Ziege anti-GRN Ak	<i>Antikörper-Online.de (DE)</i>
Ziege anti-human IgG Fab-biotin. Ak	<i>Dianova, Hamburg (DE)</i>

Tabelle 4: Antikörper

3.1.4.3 Lösungen

Material	Herstellung
Coating Puffer	<i>Lösung A:</i> 2,12 g NaCO ₃ ad 100 ml Aqua dest <i>Lösung B:</i> 1,68 g NaHCO ₃ ad 100 ml Aqua dest ➔ 1,7 ml Lösung A + 0,8 ml Lösung B + 7,5 ml Aqua dest Lagerung bei 4°C
POX-OPD-Entwicklungslösung	<i>Lösung A:</i> 0,2 M Dinatriumphosphat * 2 H ₂ O (3,56 g in 100 ml Aqua dest.) <i>Lösung B:</i> 0,1 M Zitronensäure * 1 H ₂ O (2,1 g in 100 ml Aqua dest.) ➔ 2,5 ml Lösung A + 2,5 ml Lösung B + 5 ml Aqua dest. + 1 Tablette OPD + 5 µl H ₂ O ₂ (30%)
TBS	8,76 g NaCl 6,05 g TRISZMA Hydrochlorid 1,4 g TRIS Ad 1000 ml Aqua dest.
TBS-Tx	TBS + 0,1% Tx 100 (Zugabe von 1 ml Tx 100)

Tabelle 5: Lösungen

3.2 Methodik

3.2.1 Immunologische Testverfahren

3.2.1.1 Grundlagen der ELISA-Tests

Die Abkürzung ELISA bedeutet **E**nzyme-linked **I**mmunosorbent **A**ssay und beschreibt ein immunologisches, enzymvermitteltes Nachweisverfahren, welches 1971 erstmals von Perlmann und Engvall (Schweden) sowie Schuurs und Weemen (Niederlande) beschrieben wurde [36]. Zuvor war ein vergleichbarer quantitativer Nachweis nur mithilfe von radioaktiv markierten Antikörpern möglich. Jenes Verfahren, das Radioimmunoassay (RIA), wurde erstmals im Jahr 1960 durch Berson und Yalow beschrieben [63]. Dennoch etablierte sich das ELISA Verfahren aufgrund der zahlreichen Vorteile rasch. Zu nennen wäre der im Vergleich zum RIA deutlich geringere technische Aufwand, die hohe Sensitivität, die gute Reproduzierbarkeit, das Auskommen ohne Radioaktivität und die einfache, schnelle und vielseitige Anwendbarkeit [26].

Im Folgenden soll die Funktionsweise beschrieben werden:

Grundprinzip des ELISA ist der indirekte, quantitative oder semiquantitative Nachweis eines Antigens oder Antikörpers durch ein Enzym. In diesem Beispiel gehen wir von einem Antigenscreening aus. Ein dem gesuchten Antigen komplementärer Antikörper wird auf einer Mikrotiterplatte gebunden und mit der Probe benetzt. Wenn vorhanden, geht das Antigen mit dem Antikörper eine Bindung ein, welche eine hohe Belastungsfähigkeit aufweist. Die ELISA-Platte wird mehrfach gewaschen, sodass sich in Lösung befindliche Antigene entfernt werden. Nun erfolgt die Kopplung mit dem sogenannten Reporterenzym. Dieser Vorgang kann sich je nach ELISA-Variante leicht unterscheiden, oft sind weitere Sekundärantikörper notwendig. Ist das Enzym gebunden, kann nun durch Zugabe eines Substrats der Nachweis erfolgen. Durch die Enzymaktivität kommt es in den positiven Proben zu einem Farbumschlag, welcher sich photometrisch messen lässt und so einen quantitativen Rückschluss auf die Menge des Antigens ermöglicht. Beispiele für mögliche Enzyme sind Beta-Galactosidase, Glucose-Oxidase, Alkalische Phosphatase oder, wie in dieser Arbeit, Peroxidase [5].

In den folgenden Abschnitten soll kurz auf die verschiedenen Varianten des direkten, indirekten, kompetitiven und Sandwich ELISA eingegangen werden. Dabei gehören alle Verfahren in die Gruppe der heterogenen Immunoassays, d.h. die Bindung der beiden Moleküle im ersten Schritt läuft zwischen einer festen und flüssigen Phase ab und ermöglicht so die für den Nachweis unerlässlichen Waschzyklen [5].

Direkter ELISA (Antigen Screening): Bei dieser ursprünglichen, erstmals 1971 durch Engvall, Perlmann, Weemen und Schuurs beschriebenen Variante [18], [36] wird auf der Plattenoberfläche ein Antikörper gebunden. Das gesuchte Antigen (in diesem Fall bereits enzymgebunden) verbleibt nach Inkubation und Waschvorgang in der Antikörperbindung, sodass im Folgenden ein Nachweis des Antigens per Substratzugabe möglich ist [5].

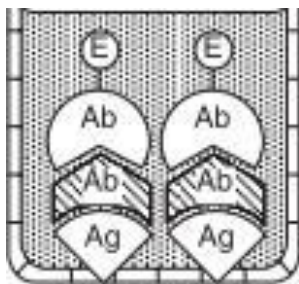


Abbildung 1:
Schematische
Darstellung des
indirekten ELISA; E:
Enzym, Ab: Antikörper,
Ag: Antigen,
Bildausschnitt [26]

Indirekter ELISA (Antikörper Screening): Diese Variante wurde erstmals 1978 von Lindström und Wager beschrieben [37]. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt wird im ersten Schritt ein Antigen auf der Plattenoberfläche gebunden, an welches man im nächsten Schritt einen komplementären, mit der Probe zugegebenen Antikörper binden kann. Dieser geht in einem weiteren Schritt eine zweite Bindung mit einem enzymgebundenen Sekundärantikörper ein, welcher den Nachweis ermöglicht [5], [37].

Kompetitiver ELISA: Diese ELISA Variante wurde erstmals 1976 durch Yorde beschrieben [65]. Dabei wird die Plattenoberfläche mit einem Antigen (oder Antikörper) ausgekleidet und im nächsten Schritt sowohl die Probe mit enthaltenem Antikörper (oder Antigen) als auch ein kompetitiver, enzymgebundener Antikörper

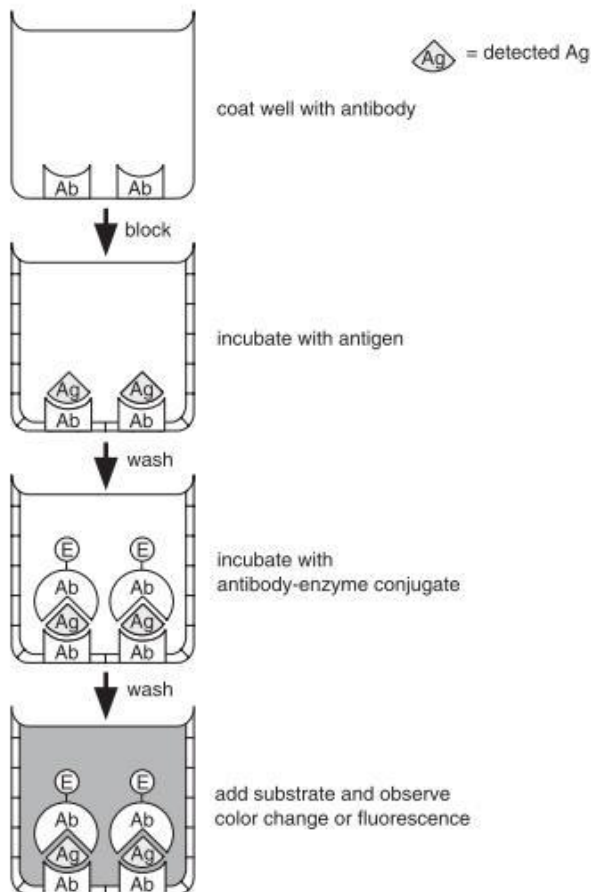


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA; E: Enzym, Ab: Antikörper, Ag: Antigen, Bildausschnitt [26]

(oder Antigen) zugegeben [5]. Beide löslichen Moleküle stehen in Konkurrenz zueinander, sodass umso mehr des enzymgebundenen Antikörpers (oder Antigens) binden, desto weniger das nachzuweisende Molekül vorhanden ist. Die Farbreaktion/ Absorption ist also umso niedriger, je höher die Konzentration des nachzuweisenden Moleküls ist [5].

Sandwich ELISA: Diese Form des ELISA, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, wurde erstmals 1977 von Kato et. al. beschrieben [30]. Hierbei wird die Mikrotiterplatte mit Antikörpern ausgekleidet und anschließend mit einer Lösung geblockt (d.h. unspezifische Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche besetzt, um falsch positive Reaktionen zu verhindern). Im nächsten Schritt wird die Probe hinzugegeben und inkubiert, danach werden durch einen Waschvorgang ungebundene Antigene entfernt. Im Folgenden wird ein enzymgebundener und an einem zweiten Epitop des Antigens bindender Sekundärantikörper hinzugegeben und erneut inkubiert (Wie in Abbildung 2 schematisch gezeigt). Nach dem anschließenden Waschen wird das Substrat addiert und der Farbumschlag ausgewertet. Namensgebend ist die „sandwichartige“ Anordnung des Antigens zwischen beiden

Antikörpern. Vorteil dieser ELISA-Variante ist die um den Faktor zwei bis fünf erhöhte Sensitivität gegenüber allen anderen Formen [5]. Hornbeck et. al. beschreibt diese ELISA-Konfiguration als die sensitivste Methode und definiert für Antigene eine Nachweisgrenze von 100pg/ml bis 1ng/ml [26].

3.2.1.2 Progranulin Antigen ELISA

Alle Progranulin ELISA wurden im José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie Homburg/Saar unter Verwendung von 96-Well NUNC Maxisorp F Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur durchgeführt. Jede Messung erfolgte in doppelter Form in nebeneinanderliegenden Vertiefungen, zudem erfolgte pro Mikrotiterplatte eine (ebenfalls doppelte) Positiv- sowie Negativkontrolle mit Referenzproben. Die Blutentnahmen für die Bestimmungen wurden in der rheumatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt und am gleichen Tag in das José Carreras Zentrum gebracht, dort zentrifugiert und die Seren bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Proben aus der rheumatologischen Praxis in Berlin-Lichtenberg wurden dort zentrifugiert und bei -20°C zwischengelagert. Erst dann erfolgte eine gesammelte Zustellung an das José-Carreras-Zentrum. Dabei wurde die Kühlkette zu keiner Zeit unterbrochen.

Coating: In diesem Prozess wird jedes Well mit dem Antikörper ausgekleidet. Dazu wurde der Ziegen anti-GRN Ak 1:2500 in TBS verdünnt. Pro Vertiefung wurden 50µl appliziert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Blocken: Jeder Vertiefung wurden 100 µl 1,5%ige Gelatine in TBS zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt werden unspezifische Bindungsstellen blockiert und damit im Verlauf falsch positive Reaktionen vermieden.

Zugabe der Seren: Die Testseren wurden 1:2 in TBS verdünnt, in die jeweiligen Wells gegeben (20µl) und danach über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In die Vertiefungen für die Positiv- und Negativkontrollen erfolgte die Zugabe der Referenzproben (GRN positiv und GRN negativ).

Zugabe des Detektionsantikörpers: Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden pro Well 50µl des Spez. Ak gegen hyperphosphoryliertes GRN (Konzentration 10µl/ml) zugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur.

Zugabe des biotinierten Antikörpers: Nach drei weiteren Waschvorgängen mit TBS wurde der Ziegen anti-human IgG Fab-biotin. Ak, verdünnt 1:2500 in TBS, mit 50µl pro Vertiefung zugegeben. Im Folgenden fand eine erneute einstündige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Das Biotin dieses Antikörpers dient als Bindungsstelle für das im nächsten Schritt zugegebene Enzym.

Zugabe der Streptavidin Peroxidase: Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgte in jedes Well die Zugabe von 50µl Streptavidin Peroxidase verdünnt 1:50000 in TBS. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Streptavidin bindet in diesem Schritt zusammen mit dem Enzym Peroxidase an das Biotin.

Entwicklung mit OPD: Nach weiteren drei Waschvorgängen mit TBS erfolgte die Zugabe des Substrats. Dazu wurde in jede Vertiefung 100µl der POX-OPD-Entwicklungslösung gegeben. O-Phenyl-Diamin (OPD) ist das Substrat der Peroxidase und verändert seine Farbe in Anwesenheit des Enzyms von transparent zu gelb. Nach Umschlagen der Farbe erfolgte die Zugabe von 20µl 3M HCL Lösung pro Well, um die Reaktion zu beenden.

Auswertung: Der Farbumschlag der Proben war qualitativ auch ohne weitere Hilfsmittel wahrzunehmen. Dauerte dieser ungewöhnlich lange oder waren die Referenzmessungen falsch positiv oder falsch negativ, wurden die Proben verworfen. Um die ELISA-Mikrotiterplatten quantitativ auszuwerten, wurde ein Victor 2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Freiburg) verwendet. Mit diesem Photometer erfolgte die Messung der jeweiligen Extinktion bei 490 nm. Bei Überschreiten der dreifachen Standardabweichung der Negativ-Referenzprobe wurde eine Probe als positiv gewertet.

3.2.1.3 Progranulin Antikörper ELISA

Die Ergebnisse des Progranulin-Antikörper ELISA wurden freundlicherweise vom José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie Homburg/Saar zur Verfügung

gestellt. Die Durchführung entsprach der Methode, welche von Thurner et. al bereits ausführlich beschrieben wurde [55].

3.2.1.4 TNF α ELISA

Die Blutentnahmen für die TNF α -Bestimmungen wurden ausschließlich in der ambulanten rheumatologischen Praxis in Berlin-Lichtenberg durchgeführt. Dort wurden die Proben innerhalb von 20 Minuten sowohl zentrifugiert als auch bei -20°C eingelagert. Erst dann erfolgte eine gesammelte Zustellung an das José-Carreras-Zentrum. Eine ausreichende Kühlung wurde zu jeder Zeit sichergestellt.

Für die TNF α Bestimmungen wurde ein kommerziell erhältliches ELISA Kit verwendet (Quantikine® Elisa Human TNF- α , R&D Systems (USA)) und entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Vorgehensweise soll im Folgenden kurz erläutert werden:

1. Vorbereitung aller Reagenzien, der Standardlösungen und der Mikrotiterplatte
2. Gabe von 50 μ l RD1F in jedes Well
3. Gabe von 200 μ l der Probe/Standardlösung/Kontrolle in jedes Well
4. Durchführung von insgesamt vier Waschzyklen mit dem Waschpuffer (400 μ l/Well)
5. Gabe von 200 μ l TNF α -Konjugat in jedes Well, anschließend Abdeckung der Mikrotiterplatte und Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur
6. Erneut Durchführung von vier Waschzyklen mit dem Waschpuffer (400 μ l/Well)
7. Gabe von 200 μ l Substratlösung in jedes Well. Inkubation unter Lichtschutz über 20 Minuten bei Raumtemperatur
8. Gabe von 50 μ l Stopp-Lösung in jedes Well
9. Auswertung mittels Photometer bei 450nm (Evtl. mit Wellenlängenkorrektur) innerhalb von 30 Minuten

3.2.2 Klassifikations- und Scoringsysteme

3.2.2.1 ACR/EULAR Kriterien von 2010

Die ACR/EULAR Kriterien von 2010 waren das Ergebnis einer Kooperation zwischen dem amerikanischen ACR und der europäischen EULAR, deren Grundstein im Jahre 2007 während eines Expertentreffens in Zürich gelegt wurde [31]. Ziel war es, die ARA (American Rheumatism Association) Kriterien von 1987 weiterzuentwickeln, um vor allem Patienten in einem frühen Krankheitsstadium erfassen und diagnostizieren zu können [2], [31]. Während bis 2010 vor allem Späterscheinungen wie etwa Erosionen und Rheumaknoten im Vordergrund standen und serologisch allein Rheumafaktoren gewichtet wurden, gibt es in den neuen Kriterien auch Punkte für positive anti-CCP, erhöhtes CRP sowie für eine verlängerte BSG; zudem ist es seit 2010 auch bei Patienten mit Beschwerden < 6 Wochen möglich, die Diagnose „Rheumatoide Arthritis“ zu stellen [2], [31].

In den neuen ACR/EULAR Kriterien von 2010 werden Punkte vergeben für die Anzahl der betroffenen Gelenke (vor allem Metacarpophalangeal- (MCP), proximale Interphalangeal- (PIP) und Metatarsophalangealgelenke (MTP)), für positive / hoch positive RF und anti-CCP, erhöhtes CRP, verlängerte BSG und für eine Symptombdauer ≥ 6 Wochen. Ein Punktwert ≥ 6 sichert die Diagnose Rheumatoide Arthritis, weitere Details siehe Abbildung 3. Die Aussagekraft dieser neuen Klassifikation wurde mehrfach wissenschaftlich belegt [8], [29].

3.2.2.2 ARA Kriterien von 1987

Die älteren Kriterien von 1987 erfordern für die Diagnose der rheumatoiden Arthritis mindestens vier der folgenden sieben Kriterien [41]:

1. Morgensteifigkeit über mindestens eine Stunde
2. Arthritis an 3 oder mehr Gelenken (gewertet werden PIP, MCP, Handgelenk, Ellbogen, Knie, Ankle, MTP und Sprunggelenk)
3. Arthritis der Hand (gewertet werden Handgelenk, MCP, PIP) über mindestens 6 Wochen
4. Symmetrische Arthritis über mindestens 6 Wochen (Gelenke siehe 2.)
5. Rheumaknoten
6. Positive Rheumafaktoren
7. Radiologische Veränderungen (z.B. Erosionen) [41]

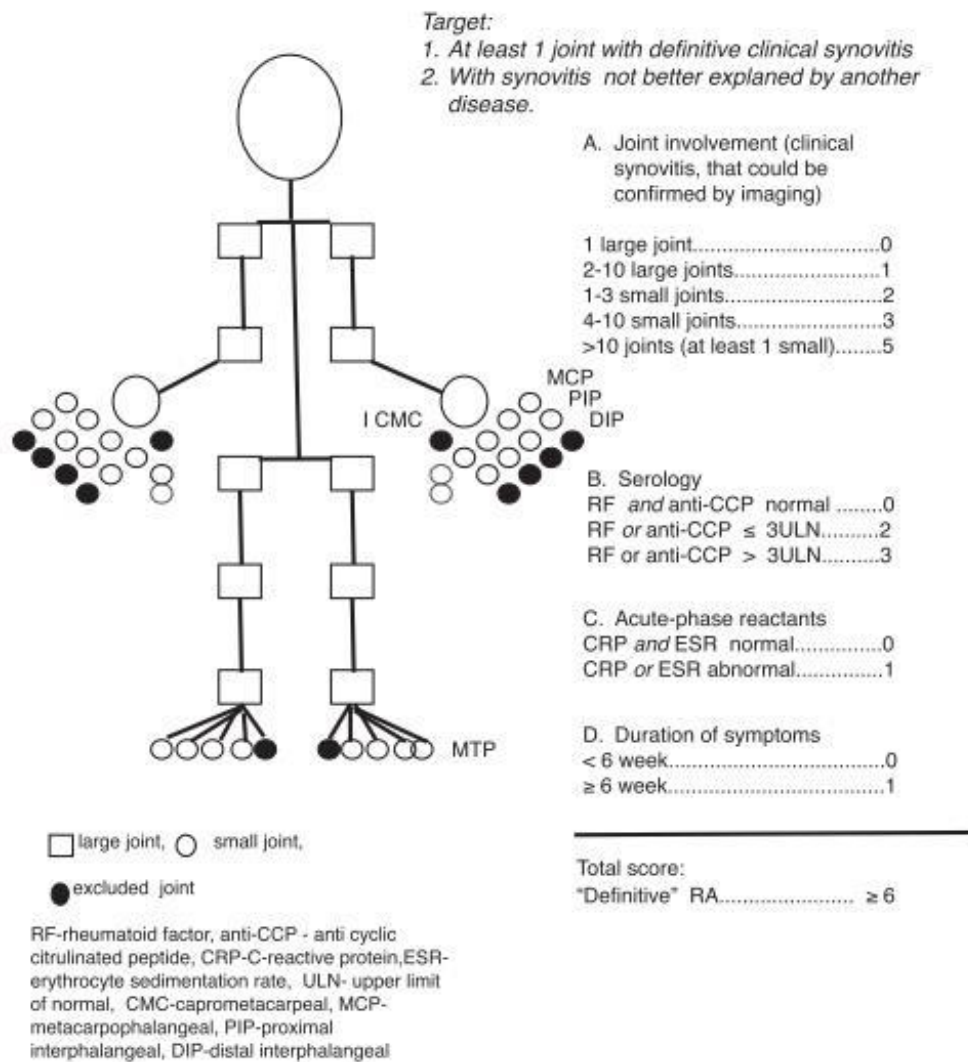


Abbildung 3: Definition und Punktevergabekriterien der ACR/EULAR Klassifikationskriterien von 2010 [33]

3.2.2.3 DAS 28

Der DAS 28 Score („Disease Activity Score 28“) ist ein Instrument zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Rheumatoider Arthritis und wurde ursprünglich an der Universität Nijmegen, Niederlande entwickelt [19]. Zentrales Element ist die Auszählung der geschwollenen und schmerzhaften Gelenke an 28 definierten Stationen, parallel fließen die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) (alternativ das C-reaktive Protein (CRP)) und die subjektive Krankheitswahrnehmung des Patienten (angegeben auf einer visuellen Analogskala) in die Berechnung mit ein [19].

Der Score kann Werte zwischen 0 und 9.4 annehmen, dabei spricht man bei Werten < 2.6 von einer Remission, bei Werten \leq 3.2 von einer niedrigen Krankheitsaktivität,

bei Werten > 3.2 und ≤ 5.1 von einer mittleren Aktivität und bei Werten > 5.1 von einer hohen Aktivität [19]. Sowohl der DAS28 mit der BSG als Berechnungsgrundlage sowie jener mit CRP sind etablierte und validierte Werkzeuge in der modernen RA Therapie [62].

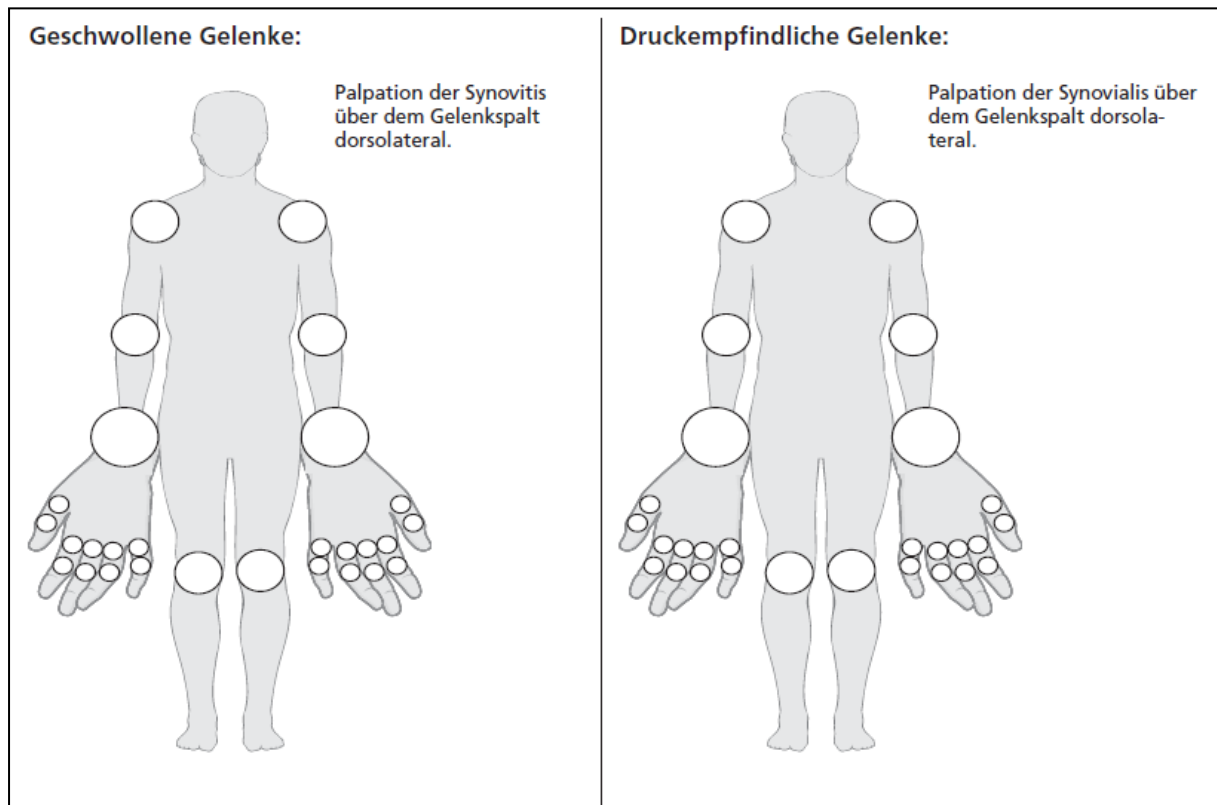


Abbildung 4: Darstellung der 28 für den DAS28 relevanten Gelenke und deren Beurteilung, [35]

3.2.2.4 HAQ

HAQ steht für „Health Assessment Questionnaire“ und beschreibt einen Fragebogen, welcher die Einschränkungen durch eine entzündlich-rheumatische Gelenkerkrankung erfassen soll. Die Entstehungsgeschichte geht zurück in die 70er Jahre, als der Fragebogen von Jim Fries an der Stanford University entwickelt wurde [20]. Heutzutage wird er weltweit eingesetzt, die Aussagekraft wird durch verschiedene Arbeiten belegt [10], [45].

Der Bogen wird vom Patienten eigenhändig ausgefüllt und fragt Einschränkungen zu den Bereichen Ankleiden/Körperpflege, Aufstehen, Essen und Trinken, Gehen, Hygiene, Erreichen von Gegenständen, Greifen und Sonstige ab. Das Punktesystem sieht pro Item die Vergabe von 0 bis 3 Punkten vor (0: Ohne Schwierigkeiten, 1: Mit einigen Schwierigkeiten, 2: Mit großen Schwierigkeiten, 3: Nicht dazu in der Lage). Zudem

werden weitere Punkte für die Notwendigkeit von Hilfsmitteln vergeben. Zur Berechnung wird aus den jeweils höchsten Werten einer Kategorie ein Mittelwert gebildet, darüber hinaus werden für etwaige Hilfsmittel Extrapunkte vergeben. In der Gesamtauswertung beträgt der niedrigste Wert 0 (keine Behinderung), während die maximale Punktzahl bei 3 (höchste Behinderung) liegt; dabei zeigen Punktwerte zwischen 0 und 1 eine milde bis moderate Ausprägung an, Punktwerte zwischen 1 und 2 eine moderat bis schwere Ausprägung und Werte zwischen 2 und 3 eine schwere bis sehr schwere Ausprägung der Behinderung [8].

	OHNE jede Schwie- rigkeit	Mit EINIGEN Schwie- rigkeiten	Mit GROSSEN Schwie- rigkeiten	Nicht dazu in der Lage
① Ankleiden und Körperpflege				
Können Sie sich ankleiden, inkl. Binden von Schnürsenkeln und Schließen von Knöpfen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
Können Sie sich die Haare waschen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
② Aufstehen				
Können Sie von einem Stuhl ohne Armlehnen aufstehen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
Können Sie sich ins Bett legen und wieder aufste- hen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
③ Essen und Trinken				
Können Sie Fleisch schneiden?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
Können Sie eine volle Tasse oder ein volles Glas zum Mund führen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
Können Sie eine neue Milchtüte öffnen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
④ Gehen				
Können Sie im Freien auf ebenem Gelände ge- hen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>
Können Sie fünf Treppenstufen hinaufsteigen?	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="2"/>	<input type="text" value="3"/>

Abbildung 5: Beispielhafter Auszug der Items 1 bis 4 aus dem HAQ, [35]

3.2.2.5 Larsen-Score

Der Larsen Score ist ein Hilfsmittel, um die Rheumatoide Arthritis in radiologische Stadien einzuteilen, wurde 1974 von Arvi Larsen entwickelt und seitdem mehrfach modifiziert (zuletzt 1995) [9]. Grundlage für die Beurteilung sind radiologische Referenzbilder, die eine Einteilung in 6 Stadien ermöglichen.

Stadium 0 beschreibt einen Normalbefund, Stadium I diskrete Befunde, Stadium II Frühveränderungen (u.a. Erosionen), Stadium III mittelgradig destruierende Veränderungen, Stadium IV schwergradig destruierende Veränderungen und Stadium V Mutilationen [35]. Die detaillierte Einteilung der Stadien wird in Abbildung 6 genauer beschrieben. An dieser Stelle sei kurz erwähnt, dass vor allem im englischsprachigen Raum die alternative Scoring Methode von Sharp breite Anwendung findet [9].

I Diskrete Befunde	<input type="checkbox"/> Weichteilschwellung oder <input type="checkbox"/> gelenknahe Osteoporose und/oder <input type="checkbox"/> Gelenkspaltverschmälerung
II Frühveränderungen	<input type="checkbox"/> Erosionen oder <input type="checkbox"/> Gelenkspaltverschmälerung
III Mittelgradige destruierende Veränderungen	<input type="checkbox"/> ausgeprägte Erosionen/Usuren oder <input type="checkbox"/> Gelenkspaltverschmälerungen
IV Schwergradige destruierende Veränderungen	<input type="checkbox"/> schwere Erosionen/Usuren oder <input type="checkbox"/> Gelenkspaltveränderungen und/oder <input type="checkbox"/> Deformierung gewichttragender Gelenke
V Mutilationen	<input type="checkbox"/> Schwund der Gelenkflächen <input type="checkbox"/> Gelenkspalt nicht mehr nachweisbar <input type="checkbox"/> ausgeprägte Deformierung der gewichttragenden Gelenke

Abbildung 6: Detaillierte Einteilungskriterien des Larsen-Score in Stadium I bis V [35]

3.2.3 Aktenrecherche

Neben den laborchemischen Bestimmungen erfolgte für jeden Patienten eine ausführliche Aktenrecherche. Dabei wurden folgende Daten erhoben: Name, Vorname, Geburtsdatum, Alter, Geschlecht, Beobachtungszeitraum, Erfüllung der ACR sowie EULAR Kriterien, RF-IgM, anti-CCP, DAS28 Score (vor, während und nach einer definierten Therapie mit DMARD/TNF Alpha Blockern), HAQ Score (vor, während und nach einer definierten Therapie mit DMARD/TNF Alpha Blockern), Erosionen, Larsen Score, viszerale Beteiligung, gesamte Medikamentenhistorie, aktuelle Steroidtherapie, Medikamentenhistorie DMARD (alle Basistherapeutika, ausgeschlossen Biologika), Start und Abbruch der DMARD Therapie, aktuelle Therapie mit TNF α -Inhibitor, Start und Abbruch der aktuellen TNF α -Inhibitor Therapie, Grund Abbruch TNF α -Inhibitor Therapie, TNF α -Inhibitor Nachfolgetherapie, Anzahl verschiedener TNF α -Inhibitor Therapien, n aktuelle TNF α -Inhibitor Therapie, TNF α -Inhibitor Therapieversagen. Die Ergebnisse der Laboranalyse wurden in Form folgender Parameter festgehalten (jeweils im Serum): Progranulin Status und Extinktion, Progranulin Antikörper Status und Extinktion sowie die TNF α -Konzentration (pg/ml).

In der nachfolgenden Tabelle soll noch einmal detailliert darauf eingegangen werden, welche Parameter erhoben wurden, welche Einheiten und Grenzwerte Verwendung fanden und wie etwaige Einschluss- oder Ausschlusskriterien definiert waren (alphabetische Sortierung).

<u>Abbruch DMARD:</u>	Zeitpunkt Abbruch DMARD Medikation (Monat/Jahr oder 0(kein))
<u>ACPA:</u>	Nachweis von Antikörpern gegen das zyklisch citrullinierte Peptid, in U/ml, Grenzwert ≥ 5 U/ml
<u>ACR:</u>	Erfüllung der ACR Diagnosekriterien (2010) für RA (0/1)
<u>Alter:</u>	Laut Akten, in Jahren (zum Zeitpunkt der Aktenrecherche)
<u>Beobachtungszeit:</u>	Zeitraum zwischen erster und letzter Dokumentation, in Monaten
<u>DAS28 0:</u>	DAS28 Score zum Zeitpunkt vor einer Therapie mit DMARD

<u>DAS28 D1:</u>	DAS28 Score zum Zeitpunkt 1 während einer DMARD Therapie
<u>DAS28 D2:</u>	DAS28 Score zum Zeitpunkt 2 während einer DMARD Therapie
<u>DAS28 N:</u>	DAS28 Score zum Zeitpunkt nach einer TNF α -i Therapie
<u>DAS28 T1:</u>	DAS28 Score zum Zeitpunkt 1 während einer TNF α -i Therapie
<u>DAS28 T2:</u>	DAS28 Score zum Zeitpunkt 2 während einer TNF α -i Therapie
<u>DMARD (non biological):</u>	In Zahlen kodiert, gesamte Historie, wenn Medikation mit: Methotrexat (2), Sulfasalazin (3), Hydrochloroquin (4), Leflunomid (5), Cyclosporin (6), Resochin (16), Azathioprin (17), Gold (18), Cyclophosphamid (19), D Penicillamin (21)
<u>Erosiv:</u>	Bei erosiver Gelenkbeteiligung (Larsen ≥ 2), (0/1)
<u>EULAR:</u>	Erfüllung der EULAR Diagnosekriterien (2010) für RA (0/1)
<u>Ext PGRN Ak:</u>	Extinktion PGRN Antikörper
<u>Ext PGRN:</u>	Extinktion PGRN Status
<u>Geburtsdatum:</u>	Laut Akten (tt.mm.jjjj)
<u>Geschlecht:</u>	Laut Akten (m/w)
<u>Grund Abbruch:</u>	Grund TNF α -Inhibitor-Therapieabbruch (Wirkungslosigkeit / Infekt / Patientenwunsch / Unverträglichkeit / Remission / Kinderwunsch)
<u>Larsen:</u>	Larsen Score (L1 – L5)
<u>Laufnummer:</u>	Durchnummerierung der Proben
<u>Medikamente:</u>	Auflistung der gesamten Medikamentenhistorie, in Zahlen kodiert (1: Steroide, 2: Methotrexat, 3: Sulfasalazin, 4: Hydrochloroquin, 5: Leflunomid, 6: Cyclosporin, 7: Adalimumab, 8: Certolizumab, 9: Etanercept, 10: Golimumab, 11: Infliximab, 12: Rituximab, 13: Tocilizumab, 14: Abatacept, 15: Anakinra, 16: Resochin, 17: Azathioprin, 18: Gold, 19: Cyclophosphamid, 20: Belimumab, 21: D Penicillamin)
<u>Nachfolgetherapie:</u>	Medikation nach TNF α -Inhibitor Therapie
<u>Name / Vorname:</u>	Laut Akten
<u>Patientennummer:</u>	Durchnummerierung der Patienten
<u>PGRN Ak:</u>	Nachweis PGRN Antikörper (0/1)

<u>PGRN Stat.:</u>	Nachweis PGRN Status (0/1)
<u>Probencode:</u>	Laborinterner Probencode
<u>Probendatum:</u>	Datum Probenentnahme (tt.mm.jjjj)
<u>RF:</u>	Nachweis von Rheumafaktoren (IgM), Grenzwert >20U/ml, (0/1)
<u>Start DMARD:</u>	Start DMARD Medikation (Monat/Jahr oder 0(kein))
<u>Start TNF:</u>	Startpunkt TNF α -Inhibitor Therapie (Monat/Jahr/) oder „ “
<u>Steroide:</u>	Keine Steroide (0), Steroide unterhalb der Cushing Schwelle (7,5 mg Prednisolonäquivalent) (1), Steroide überhalb der Cushing Schwelle (2)
<u>TNF Abbruch:</u>	Zeitpunkt Abbruch TNF α -Inhibitor Therapie (Monat/Jahr) oder „ “
<u>TNF Th. Anzahl:</u>	Anzahl verschiedener TNF α -Inhibitor Therapien, wenn >1 dann weiterer Datensatz
<u>TNF Zyklus:</u>	Aktuelle TNF α -Inhibitor Therapie (Nummer)
<u>TNF:</u>	Medikation mit TNF α -Inhibitor (Adalimumab / Certolizumab / Etanercept, / Golimumab, / Infliximab / 0 (kein))
<u>Versagen:</u>	TNF α -i Therapieversagen, wenn alle bisherigen Therapien wegen Wirkungslosigkeit abgebrochen wurden (0/1)
<u>Viszerale Beteiligung:</u>	Bei zusätzlichem Auftreten von subcutanen Knoten, Vasculitis, Perikarditis, Pleuritis, Vaskulitis assoziiertem Felty-Syndrom, Glomerulonephritis, Episkleritis, Keratokonjunktivitis sicca, sekundäre Amyloidose oder Anämie (0/1) [33]
<u>Zeitpunkt:</u>	Durchnummerierung der Verlaufsmessungen pro Patient, beginnend jeweils bei 1.

Tabelle 6: Erläuterungen zu den Parametern der Aktenrecherche

3.2.4 Statistik

Unterschiede in den Variablen Alter, Krankheitsdauer, DAS28 (mittel) und HAQ (mittel) wurden mit dem t- und Levene Test auf Gleichheit der Varianzen untersucht. Die Unterschiede der Parameter Geschlecht, Erosionen, Larsen Score, RF-IgM, anti-CCP, TNF α Spiegel (erhöht vs. nicht erhöht, nur in der Kohorte mit TNF α -Inhibitor Versagen) wurden per univariater Analyse mit dem χ^2 Test untersucht. Die Analyse der Patienten-Subgruppe mit TNF α -Inhibitor Versagen wurde mit den o.g. Variablen durch den Student's t-test und dem χ^2 (univariate Analyse) untersucht. Dabei wurden hoch signifikante Unterschiede weiter mit multivariater logistischer Regression untersucht, um jeweilige Parameter bezüglich ihrer Unabhängigkeit von weiteren Variablen und ihrer Signifikanz für ein TNF α -Inhibitor Versagen beurteilen zu können (multivariate Regressionsanalyse und Wald Test). Für alle Werte wurde die entsprechende Odds Ratio mit Konfidenzintervall berechnet. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS Version 18.1 für Microsoft Windows durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Fragestellung

Die pathologische Bedeutung von PGRN und des dagegen gerichteten PGRN AK ist gerade in Bezug auf die RA noch nicht gänzlich verstanden. Während die Bedeutung des PGRN in Hinblick auf Wirkungsmechanismen [53], Prognose [11] und experimentellen Therapiemöglichkeiten [39], [53] betrachtet wurde, gibt es wenig Arbeiten zum Thema RA und PGRN Ak. Einzig Thurner et. al. beobachteten in einer kleinen Fallstudie von 44 Patienten mit RA bei 16 Patienten den Nachweis von PGRN Ak [55].

Mit RF und anti-CCP stehen bewährte und altgediente laborchemische Marker zur Verfügung, jedoch gibt es gerade in der Frühdiagnostik serologisch unauffälliger Patienten nach wie vor Bedarf an neuen, für die Diagnostik geeigneten Autoantikörpern [59]. Der Sachverhalt wird bei Betrachtung der jeweiligen Sensitivitäten (75-80% für RF IgM [17] und 71.7 % für anti-CCP [59]) deutlich. Während der RF im Serum von bis zu 20% der gesunden Bevölkerung nachweisbar ist, ist der PGRN AK nach gegenwärtigen Untersuchungen bei gesunden Probanden negativ [1]. Auch die Spezifität der RF ist problematisch. Neben einer Optimierung von Sensitivität und Spezifität wären darüber hinaus gehende Vorhersagemöglichkeiten beispielsweise in Hinblick auf Therapieaussichten, die Krankheitsaktivität sowie die Prognoseabschätzung, welche die Möglichkeiten der klassischen Seromarker übertreffen, zu begrüßen.

Die grundlegenden Fragen dieser Arbeit sind deshalb:

Wie hoch ist die Prävalenz der PGRN Ak bei Patienten mit RA und können Aussagen bezüglich der Eignung als Diagnosemarker gemacht werden? Gibt es Unterschiede in der Häufigkeit von PGRN AK im Serum von seronegativen zu seropositiven RA-Patienten (RF+, anti-CCP +)? Welche Prävalenz von PGRN AK gibt es in Hinblick auf die Subgruppen der RA-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (bspw. DAS 28 und HAQ), Erosionen (bspw. Larsen Score), unterschiedlichem Geschlecht und Alter? Wie häufig sind PGRN AK positive RA Patienten mit fehlendem Therapieansprechen auf TNF α -Inhibitoren?

4.2 Progranulin-Antikörper in der RA-Kohorte

Von insgesamt $n = 317$ Patienten konnten 305 Probanden auf den PGRN Ak untersucht werden (fehlende Daten bei $n = 12$ Patienten). Dabei zeigte sich eine Prävalenz des PGRN Ak von 26.6% (81 von 305 Patienten).

Die Betrachtung der PGRN Ak in Bezug zum jeweiligen rheumatologischen Serostatus, also dem Auftreten von RF (IgM) und anti-CCP, soll in dieser Arbeit im Vordergrund stehen und wird im folgenden Kapitel dargestellt. Unsere Daten zeigen, dass Patienten mit einem negativen Serostatus in mehr als einem Viertel der Fälle einen positiven PGRN Ak aufweisen. Insgesamt stehen uns Daten von $n = 292$ Patienten zur Verfügung, bei denen sowohl der Serostatus als auch der PGRN Ak Status erhoben wurde (Fehlende Daten bei $n = 25$ Patienten)

4.3 Subgruppenverteilung des Progranulin Antikörpers

4.3.1 Progranulin Antikörper und Serostatus

Die Gruppe der seropositiven Patienten setzt sich zusammen aus Patienten mit sowohl positivem RF, anti-CCP und PGRN Ak (14.7%, 43 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit positivem RF, negativem anti-CCP und positivem PGRN Ak (4.8%, 14 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit negativem RF, positiven anti-CCP und positivem PGRN Ak (1%, 3 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit positivem RF, positivem anti-CCP und negativem PGRN Ak (39.4%, 115 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit negativem RF, positivem anti-CCP und negativem PGRN Ak (7.9%, 23 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit positivem RF, negativem anti-CCP und negativem PGRN Ak (8.2%, 24 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit positivem RF und positivem PGRN Ak (1.4%, 4 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit positivem RF und negativem PGRN Ak (6.2%, 18 von insgesamt 292 Patienten) und Patienten mit positivem anti-CCP und negativem PGRN Ak (0.7%, 2 von insgesamt 292 Patienten).

Die Gruppe der seronegativen Patienten setzt sich zusammen aus Patienten mit negativem Serostatus (sowohl RF als auch anti-CCP negativ) und positivem PGRN Ak

Nachweis (3.8%, 11 von insgesamt 292 Patienten), der Patientengruppe mit negativer Serologie und negativem PGRN Ak Befund (10.3%, 30 von insgesamt 292 Patienten), Patienten mit negativem RF und negativem PGRN Ak (1.4%, 4 von insgesamt 292 Patienten) und Patienten mit negativem RF und positivem PGRN Ak (0.3%, 1 von insgesamt 292 Patienten).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass 26.1% (12 von 46 Patienten) mit negativ rheumatologisch-serologischem Befund einen positiven PGRN Ak Status aufweisen. Bezogen auf die Gesamtgruppe entsprechen diese 12 Probanden 4.1% aller an dieser Studie teilnehmenden Patienten. Eine Darstellung der Serogruppen in Relation zum PGRN Ak Status erfolgt in Abbildung 7.

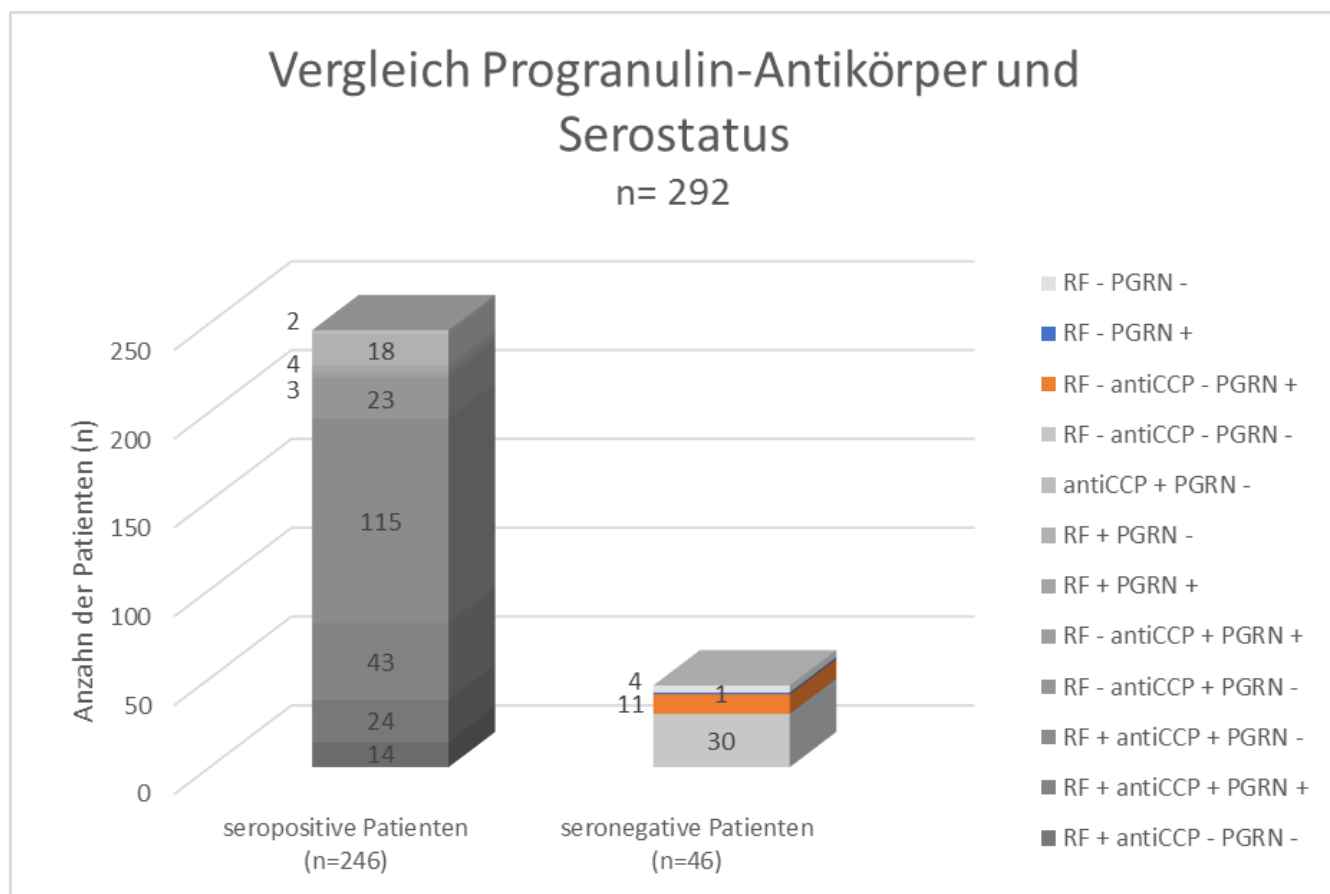


Abbildung 7: Darstellung der seropositiven und seronegativen Patientengruppen im Vergleich zum PGRN Ak Status, dabei farbliche Hervorhebung der seronegativen, aber PGRN positiven Subgruppen [21]

4.3.2 Definition weiterer Subgruppen

Neben der Analyse der Gesamtverteilung erfolgte zudem eine Betrachtung der PGRN Ak in einer Reihe von definierten Subgruppen. Unterteilt wurde in die Kategorien männliches- (n = 74 Patienten) sowie weibliches Geschlecht (n = 220 Patienten), vorhandene Erosionen (n = 162 Patienten), Larsen ≥ 2 (n = 110 Patienten), RF (IgM) positiv (n = 218 Patienten) und anti-CCP positiv (n = 186 Patienten). Die Statistik verdeutlicht, dass der PGRN Ak in einigen Gruppen überproportional sowie in anderen Gruppen unterproportional vertreten ist.

4.3.3 Progranulin-Antikörper im Vergleich zu Geschlecht, Erosionen, RF sowie anti-CCP

Bei männlichen Patienten ist der PGRN Ak in 31.1% der Fälle positiv (23 von 74 Patienten; $p = 0.001$), in der Gruppe Larsen ≥ 2 zu 30% (33 von 110 Patienten; $p = 0.024$), bei Patienten mit Erosionen in 28.4% der Fälle (46 von 162 Patienten; $p = 0.026$) und bei Patienten mit positivem RF (IgM) zu 28% (61 von 218 Patienten; $p = 0.001$). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Männer, Patienten mit erosivem Verlauf (Erosionen / Larsen ≥ 2) und Patienten mit nachgewiesenem Rheumafaktor häufiger mit einem positiven PGRN Ak assoziiert sind. Die Ergebnisse dieser Subgruppen können allesamt als statistisch signifikant angesehen werden ($p < 0.05$).

Bei Betrachtung der verbleibenden Subgruppen wird deutlich, dass in Relation zur Gesamtverteilung zum einen bei Frauen (53 von 220 Patienten, 24.1%) als auch bei Patienten mit anti-CCP Nachweis (46 von 186 Patienten, 24.8%, $p = 0.013$) vergleichsweise seltener PGRN Ak nachgewiesen werden können. Die Ergebnisse werden in Abbildung 8 visualisiert.

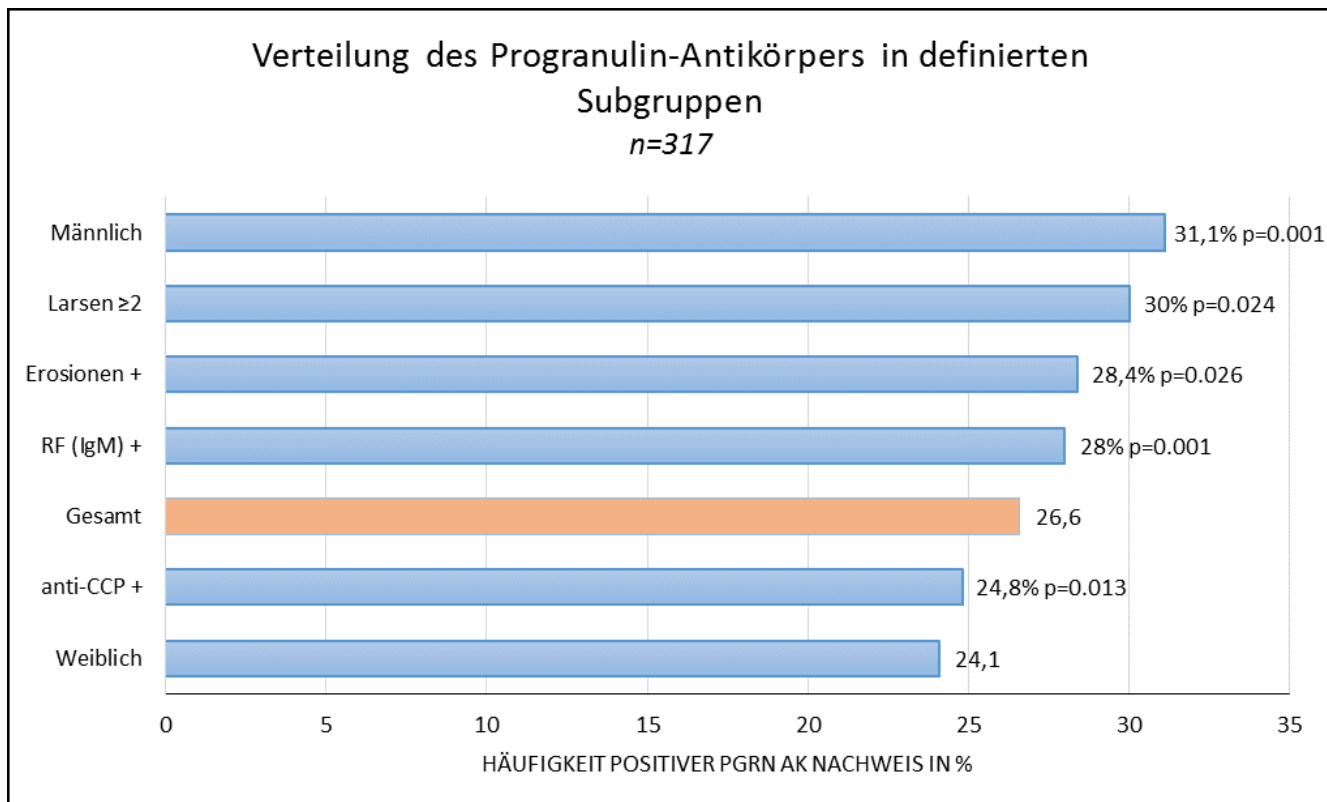


Abbildung 8: : Darstellung der PGRN Ak-Verteilung in den Subgruppen männliche- und weibliches Geschlecht, Larsen ≥2, Erosionen +, RF + und anti-CCP + im Vergleich zur Gesamtverteilung

4.3.4 Progranulin Antikörper im Vergleich zu Patientenalter, Krankheitsdauer, DAS 28 sowie HAQ

Ebenfalls in Bezug gesetzt wurde der PGRN Ak-Status zum Patientenalter, zur Krankheitsdauer, zum DAS28- sowie HAQ-Score. Dabei sei erwähnt, dass die zugrunde gelegten DAS28 und HAQ-Scores (eine Erhebung erfolgte an bis zu 6 Zeitpunkten pro Patient) nach größter zeitlicher Nähe zum Zeitpunkt der Probenentnahme ausgewählt wurden.

Bei negativem PGRN Ak-Nachweis liegt der mittlere DAS 28 Score bei 3.5, während der gemittelte DAS 28-Score bei positivem PGRN Ak bei 3.81 liegt. Ein höherer DAS 28-Wert (welcher einer höheren Krankheitsaktivität entspricht) ist demnach mit dem Auftreten von PGRN Ak assoziiert. Die Relation von DAS 28 zu PGRN Ak ist mit einem P-Wert von 0.047 statistisch signifikant.

Das mediane Alter bei PGRN Ak negativen Probanden liegt bei 62 Jahren (Minimum 19 Jahre, Maximum 93 Jahre), während letzteres im Falle positiver PGRN Ak 64.5 Jahre beträgt (Minimum 37 Jahre, Maximum 87 Jahre). Der P-Wert liegt hier bei 0.119;

damit ist das Ergebnis nach unserer Betrachtung statistisch nicht signifikant. Ebenfalls statistisch nicht signifikant ist der Bezug von Krankheitsdauer zu PGRN Ak Status (PGRN Ak +: 99,06 [Mittelwert; in Monaten]; PGRN Ak -: 96,7 [Mittelwert; in Monaten]) sowie die Beziehung HAQ und PGRN Ak (PGRN Ak +: 0,75 [Mittelwert]; PGRN Ak -: 0,71 [Mittelwert]). Die aufgezeigten Daten sind in Tabelle 7 dargestellt.

	PGRN Ab -	PGRN Ab +	P Wert	OR, KI*
Alter (in Jahren, median, min-max.)	62 (19-93)	64,5 (37-87)	P= 0,119**	
Krankheitsdauer (in Monaten, Mittelwert, SD)	96,7	99,06	P= 0,860**	
DAS 28 (Mittel, +/- SD)	3,5	3,81	P= 0,047	1.98; 0,021-0,753
HAQ (Mittel, +/- SD)	0,71	0,75	P= 0,521**	

Tabelle 7: Alter, Krankheitsdauer, DAS28 und HAQ in Relation zum PGRN Ak Status, * = Odds Ratio, Konfidenzintervall ($P < 0,05$), ** = nicht signifikant

4.3.5 Patienten mit positivem Progranulin Antikörper Nachweis:

Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie zeigen RA-Patienten mit männlichem Geschlecht, erosivem Verlauf, einem Larsen Score ≥ 2 , einem positiven RF (aber nicht anti-CCP) sowie einem höheren DAS 28-Score signifikant häufiger Serum-PGRN Ak als ihre jeweilige Vergleichsgruppe in der Subgruppenanalyse.

Die Häufigkeitsunterschiede zwischen PGRN Ak und höherem Alter, einer kürzeren Krankheitsdauer sowie einem höheren HAQ sind in dieser Untersuchung statistisch nicht signifikant.

4.4 Patienten unter TNF α -Inhibitor Therapie

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der RA-Patienten-Subgruppe mit dokumentierter TNF α -Inhibitor Therapie, zu welcher insgesamt $n = 121$ Patienten zählen, näher beschrieben werden. In dieser Gruppe war nur die Behandlung mit einem Medikament aus der Wirkstoffgruppe der TNF α Rezeptor Antagonisten, also

Adalimumab (Handelsname Humira®), Certolizumab (Handelsname Cimzia®), Infliximab (Handelsname Remicade® / Inflectra®), Golimumab (Handelsname Simponi®) oder Etanercept (Handelsname Enbrel®) berücksichtigt. Dabei zählten zu jener Patientengruppe sowohl Probanden mit aktueller als auch mit beendeter Therapie mit TNF α Rezeptor Antagonisten.

4.4.1 Progranulin-Antikörper und TNF α -Inhibitor Therapieversagen

Innerhalb der Gruppe der Patienten unter TNF α -Inhibitor Therapie ist für Patienten mit TNF α -Inhibitor Therapieversagen eine statistisch signifikante, höhere Wahrscheinlichkeit für einen positiven Serum-PGRN Ak Nachweis zu verzeichnen: 31.2 %, also 10 von 32 Patienten in der Gruppe „TNF α -Inhibitor Versagen“, weisen einen positiven PGRN Ak auf, während nur 23.2 %, also 19 von 82 der Patienten, in der Gruppe „TNF α -Inhibitor Ansprechen“ einen positiven PGRN Ak Status zeigen. Statistisch wurde dieser Zusammenhang mit dem χ^2 Test univariat analysiert ($p = 0.045$) [Daten nicht vollständig in Tabellenform gezeigt].

4.4.2 Univariate Analyse der RA-Patienten mit TNF α -Inhibitor Therapieversagen

Folgende weitere Parameter jenseits der Prävalenz von PGRN Ak waren signifikant häufiger bei TNF α -Inhibitor Versagen als bei RA-Patienten mit TNF α -Inhibitor Ansprechen (im vorliegenden Fall ist „TNF Ansprechen“ als Patientengruppe unter dauerhafter Therapie ohne Wirkverlust zu verstehen): Erosive Gelenkbeteiligung (81.3%, also 26 von 32 Patienten in der Gruppe TNF α -Inhibitor Versagen und 58.8%, also 47 von 80 Patienten in der Gruppe TNF α -Inhibitor Ansprechen), ein DAS28 ≥ 3.2 (78.6%, also 22 von 28 Patienten, in der Gruppe TNF α - Inhibitor Versagen und 67.6%, also 46 von 68 Patienten, in der Gruppe TNF α - Inhibitor Ansprechen) sowie ein positiver RF (84.4%, also 27 von 32 Patienten, in der Gruppe TNF α - Inhibitor Versagen und 78%, also 64 von 82 Patienten, in der Gruppe TNF α - Inhibitor Ansprechen) [Daten nicht vollständig in Tabellenform gezeigt].

Zudem waren ein positiver anti-CCP Wert (65.5%, also 19 von 29 Patienten, in der Gruppe TNF α - Inhibitor Versagen und 70.3%, also 52 von 74 Patienten, in der Gruppe TNF α - Inhibitor Ansprechen) und ein erhöhter Serum TNF α -Spiegel (100%, also 2 von 2 Patienten, in der Gruppe TNF α -i Versagen und 26.7%, also 4 von 15 Patienten, in

der Gruppe TNF α -Inhibitor Ansprechen) häufiger (Abbildung 9) [Daten nicht vollständig in Tabellenform gezeigt].

Klinische Parameter	TNF α -Inhibitor (n=32)	Versagen	p-Wert *
Erosionen vs. keine Erosionen Fehlende Daten: 2	81.3% (n=26) vs. 18.8% (n=6)		0.024
Larsen ≥ 2 vs. Larsen < 2 Fehlende Daten: 2	83.3% (n=25) vs. 16.7% (n=5)		0.012
DAS28 ≥ 3.2 vs. DAS28 < 3.2 Fehlende Daten: 4	78.6% (n=22) vs. 21.4% (n=6)		0.036
Serum TNF α erhöht vs. nicht erhöht fehlende Daten: 30	100% (n=2) vs. 0% (n=0)		0.4
PGRN Ak positiv vs. negativ Fehlende Daten: 0	31.2% (n=10) vs. 68.8% (n=22)		0.045
RF (IgM) positiv vs. negativ Fehlende Daten: 0	84.4% (n=27) vs. 15.6% (n=5)		0.001
Anti-CCP positiv vs. negativ fehlende Daten: 3	65.5% (n=19) vs. 34.5% (n=10)		0.041
*: Univariate Analyse, Chi2 test 2x2			

Tabelle 8: Darstellung von TNF α -Inhibitor Versagen in Betrachtung zu den jeweiligen Subgruppen

4.4.3 Risikofaktoren für TNF α -Inhibitor Therapieversagen, multivariate statistische Analyse

Neben der univariaten statistischen Analyse wurden die Parameter erosive Beteiligung, Larsen ≥ 2 , DAS 28 ≥ 3.2 , positiver PGRN Ak, positive RF und positive anti-CCP zudem per multivariater logistischer Regression untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein DAS 28 ≥ 3.2 (p=0.039) und eine erosive Beteiligung (p=0.032) jeweils unabhängig voneinander häufiger bei TNF α -Inhibitor Therapieversagen vorkommen.

Ein positiver PGRN Ak wie auch positive RF zeigten in dieser Analyse keinen unabhängigen „Risikofaktor“ für ein TNF α -Inhibitor Therapieversagen.

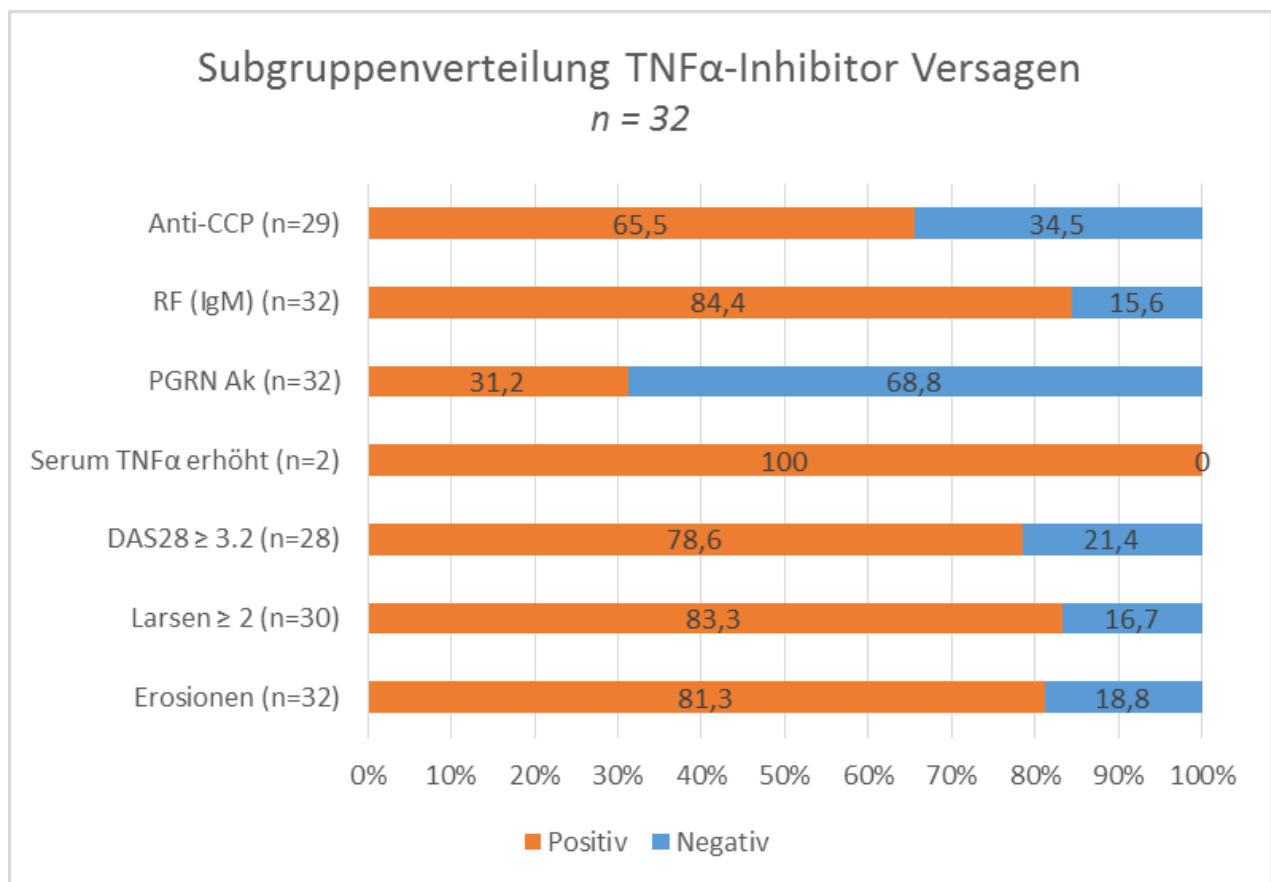


Abbildung 9: Darstellung von TNF α -Inhibitor Versagen in Betrachtung zu den jeweiligen Subgruppen

4.4.4 Patienten unter TNF α -Inhibitor Therapie: Zusammenfassung der Ergebnisse

Univariate statistische Analyse: Statistisch signifikant häufiger bei TNF α -Inhibitor Therapieversagen zeigten sich ein positiver PGRN Ak Nachweis, eine erosive Gelenkbeteiligung, ein DAS28 \geq 3.2, positive RF sowie positive anti-CCP (als bei Therapieansprechen in der Subgruppe der RA-Patienten)

Multivariate statistische Analyse: In dieser Betrachtung zeigte sich, dass nur ein erhöhter DAS 28 (\geq 3.2) und eine erosive Gelenkbeteiligung als jeweils unabhängige Variable bei TNF α -Inhibitor Therapieversagen häufiger auftritt. Der PGRN Ak ist kein unabhängiger Risikofaktor für TNF α -Inhibitor Therapieversagen.

	Unabhängige Variable für TNF α -Inhibitor Therapieversagen	P-Wert
RF	-	0.948
DAS28 ≥ 3.2	+	0.039
Erosiv	+	0.032
ACCP	-	0.463

Tabelle 9: Multivariate statistische Analyse, unabhängige Variablen für TNF α -Inhibitor Therapieversagen

4.5 Beschreibung des Patientenkollektivs

4.5.1 Alter, Geschlecht und Beobachtungszeit

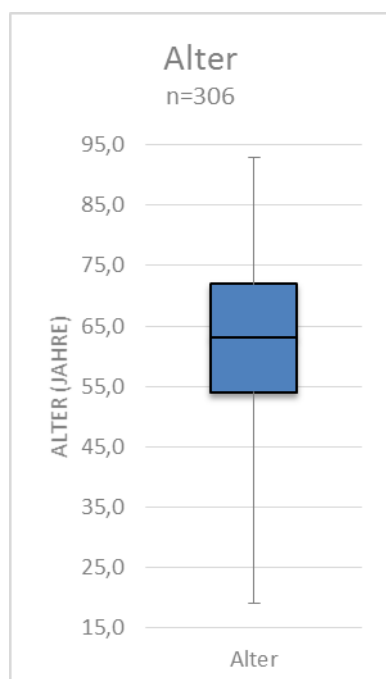


Abbildung 10: Darstellung des Patientenalters im Boxplot

Insgesamt umfasst die Studie eine Anzahl von $n = 317$ Patienten mit der Diagnose „Rheumatoide Arthritis“, welche mit Hilfe der ARA Kriterien von 1987 sowie der aktuellen ACR/EULAR Klassifikation von 2010 gestellt wurde. Das Patientenalter ist in Abbildung 10 als Boxplot dargestellt und erstreckt sich von minimal 19 Jahren bis maximal 93 Jahren; der Mittelwert beträgt 62,0 Jahre (bei 11 Patienten sind keine

Daten vorhanden). Das Geschlecht betreffend ist der Anteil weiblicher Patienten mit 74.5% (228 von 306 Patienten) deutlich in der Mehrheit; männliche Patienten machen dabei nur 25.5% (78 von 306 Patienten) der Probanden aus (bei n = 11 Patienten sind keine Daten vorhanden). Der Beobachtungszeitraum erstreckt sich von minimal einem Monat bis maximal 456 Monaten (38 Jahre), der Mittelwert beträgt hier 97,9 Monate (8,15 Jahre). Eine Visualisierung erfolgt in Abbildung 11 ebenfalls als Boxplot (bei n = 111 Patienten sind keine Daten vorhanden).

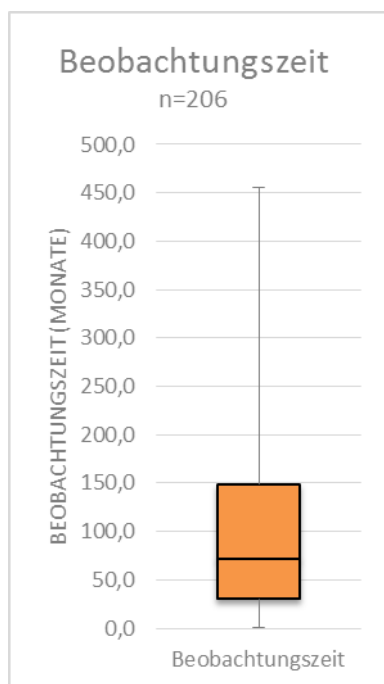


Abbildung 11: Darstellung der Beobachtungszeit im Boxplot

4.5.2 Rheumafaktor und Antikörper gegen das zyklisch citrullinierte Peptid

Bezogen auf die gesamte Patientengruppe weisen 229 von 301 Probanden (76.1%) einen positiven Rheumafaktor(IgM) auf (fehlende Daten bei n = 16 Patienten), bei 192 von 271 Patienten (70.8%) ist das Anti-CCP erhöht (keine Daten für insgesamt n = 45 Patienten).

4.5.3 Progranulin Antikörper

Der PGRN Ak ist bezogen auf die Gesamtgruppe bei 81 von 305 Probanden (26.6%) nachweisbar (keine Daten für n = 12 Patienten).

4.5.4 TNF α -Inhibitor Therapie

Eine Assoziation mit einer TNF α -Inhibitor Therapie, welche hier als aktuelle oder beendete Therapie mit der entsprechenden Medikamentengruppe (Adalimumab, Certolizumab, Infliximab, Golimumab oder Etanercept) definiert ist, wird in dieser Arbeit bei 121 von 304 Patienten (39.8%) nachgewiesen (fehlende Daten für n = 13 Probanden).

4.5.5 Larsen Score

Der Larsen Score wurde bei insgesamt 195 Patienten erhoben (fehlende Daten bei n = 122 Patienten). Einen Wert ≥ 2 erreichten dabei 112 von 195 Patienten (57.4%), einen Wert <2 erreichten 83 von 195 Patienten (42.6%)

4.5.6 DAS28 Score

Der DAS28 Score wurde bei insgesamt 238 Patienten erhoben (fehlende Daten bei n = 79 Patienten). Einen Wert ≥ 3.2 erreichten dabei 135 von 238 Patienten (56.7%), einen Wert <3.2 erreichten 103 von 238 Patienten (43.3%). Ausgewählt und verglichen wird bei dieser Betrachtung der zeitlich jeweils nächstgelegene DAS28 zur Probenentnahme.

4.5.7 HAQ Score

Der HAQ Score wurde bei insgesamt 119 Patienten erhoben (fehlende Daten bei n = 198 Patienten). Einen Wert ≥ 0.375 erreichten dabei 75 von 119 Patienten (63%), einen Wert <0.375 erreichten 44 von 119 Patienten (37%). Ausgewählt und verglichen wurde bei dieser Betrachtung der zeitlich jeweils nächstgelegene HAQ zur Probenentnahme.

4.5.8 Serum TNF α

Für die insgesamt 100 Patienten aus der rheumatologischen Praxis in Berlin-Lichtenberg wurden die Serum TNF α -Spiegel erhoben. Dabei wurden 93 Patienten (93%) negativ und 7 Patienten (7%) mit erhöhtem Serum-Spiegel getestet.

Verglichen mit dem PGRN Ak-Status weisen 21 von 93 negativ getesteten Patienten (22.6%) einen positiven PGRN Ak auf, während 2 von 7 (28.6%) der positiv getesteten

Patienten einen positiven PGRN Ak aufweisen. Der Zusammenhang von TNF α Serostatus und TNF α -Inhibitor-Ansprechen sowie -Versagen wird in Kapitel 4.3.2 genauer beschrieben.

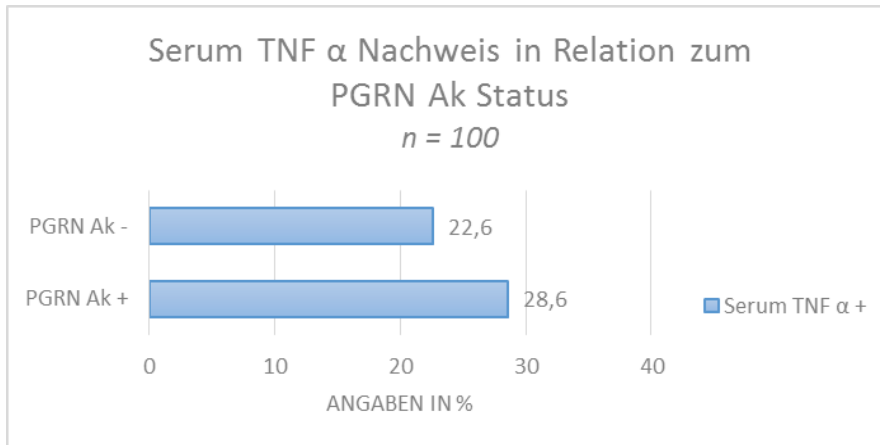


Abbildung 12: Vergleich des PGRN Ak-Status mit dem Auftreten von erhöhten Serum TNF α -Spiegeln. Unterschiede nicht signifikant ($p=0.4$, Fischer Test)

4.5.9 Progranulin-Status

Neben dem PGRN Ak-Status wurde für $n = 305$ Patienten auch der PGRN-Status erhoben. Von den 305 untersuchten Patienten wurden $n = 80$ (26.2%) positiv und $n = 225$ (73.8%) negativ getestet.

Verglichen mit der Bestimmung des PGRN Ak zeigt sich eine hohe Überschneidung mit dem PGRN Status. Von 305 Patienten weisen 296 (97%) deckungsgleich jeweils positive oder negative Ergebnisse auf, während nur 9 (3%) Patienten voneinander abweichende Ergebnisse zeigen.

4.5.10 Serokonversion Progranulin-Antikörper und Progranulin-Status

Bei insgesamt 100 Patienten wurden Mehrfachmessungen des PGRN Ak sowie des PGRN Status vorgenommen. Dabei trat bei 6 von 100 Patienten (6%) eine Serokonversion des PGRN Status auf. Bei 7 von 100 Patienten (7%) trat eine Serokonversion des PGRN Ak auf.

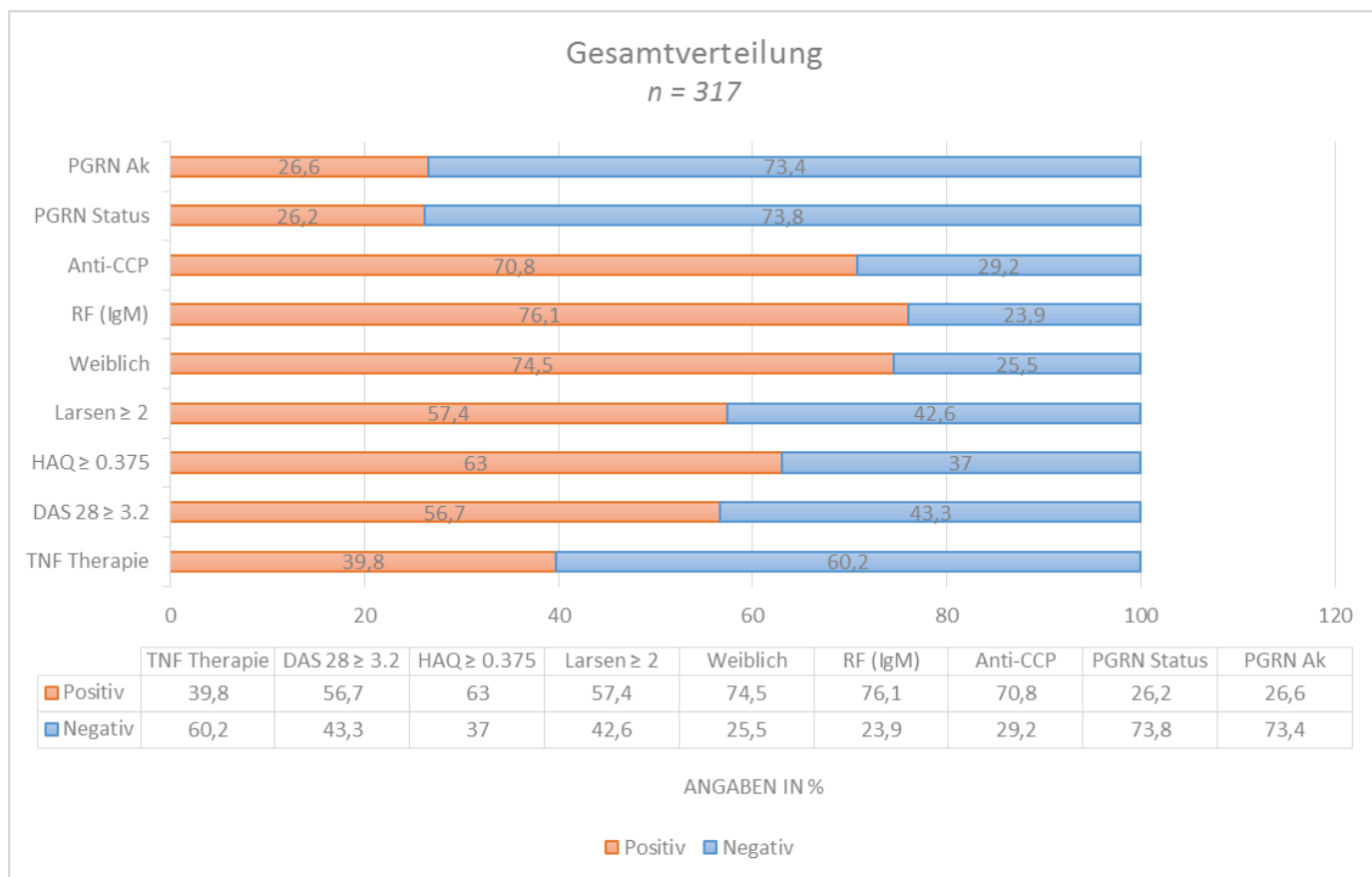


Abbildung 13: Darstellung der Gesamtverteilung erhobener Patientencharakteristika

5. Diskussion

5.1 Aussagekraft der vorliegenden Studie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Daten von insgesamt $n = 317$ Patienten ausgewertet. Neben der Bestimmung von PGRN, PGRN Ak und Serum TNF α erfolgte eine ausführliche Aktenrecherche, bei der neben der detaillierten Medikamentenanamnese, dem DAS28 und HAQ Score (jeweils zu multiplen Zeitpunkten), den ACR und EULAR Kriterien, dem Larsen Score, RF, anti-CCP und den Erosionen auch eine ausführliche Dokumentation der TNF α -Inhibitor Therapie erfolgte. Die Fallzahlen, die umfangreiche Charakterisierung der Patienten und die erstmals in diesem Umfang erfolgte Betrachtung der Prävalenz von PGRN und PGRN Ak sind eindeutige Stärken der Arbeit. Das Patientenkollektiv ist bezogen auf die Verteilung von RF (In dieser Arbeit bei 76.1% nachweisbar, Referenz in der Literatur 75 – 80% [17]), anti-CCP (In dieser Arbeit zu 70.8% positiv, Referenz in der Literatur > 50% im Frühstadium [13]) und Geschlecht (in dieser Arbeit 2,9 w : 1 m, in der Literatur 2-3 w : 1 m [17]) eindeutig repräsentativ. Von dem Umstand, dass sowohl Patienten einer Hochschulambulanz als auch einer ambulanten Praxis eingeschlossen wurden, dürfte die Studie ebenfalls profitieren.

Nachteilig sind die geringen Fallzahlen einzelner, retrospektiv definierter Subgruppen. Ein Vergleich von Serum TNF α und TNF α - Inhibitor Therapie ist nur in $n = 17$ Fällen möglich und auch die Gruppe „TNF α - Inhibitor Therapieversagen“ besteht insgesamt nur aus $n = 32$ Patienten. Darüber hinaus hätte eine größere, multizentrische Studie im Vergleich zu dieser auf Homburg/Saar und Berlin beschränkten Studie selbstverständlich eine höhere Relevanz. Zudem war das Studiendesign der klinisch bedeutsamen Gruppe der TNF α - Inhibitor Therapieversagern nicht prospektiv, sodass zusätzlich zur kleinen Fallzahl in dieser Situation der interessante Aspekt, den PGRN Ak als Prognosemarker zu untersuchen, nicht möglich war.

5.2 Progranulin Antikörper und rheumatoide Arthritis

Bisher wurde Progranulin mit biologischen Prozessen wie der Embryogenese [16], der Neurodegeneration [6], der Wundheilung [24], der Inflammation [32] und der

Tumorgenese [7],[23] in Verbindung gebracht; darüber hinaus wurde eine Beteiligung an Zellproliferation, -überleben und -migration nachgewiesen [24].

Entsprechende PGRN Ak konnten nachgewiesen werden bei primären Vaskulitiden und SLE [55], M. Crohn und Colitis Ulzerosa [56] sowie bei Psoriasis Arthritis [57]. Die Assoziation von PGRN Ak mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen war also bereits Gegenstand mehrerer wissenschaftlicher Arbeiten, eine Übersicht dazu wird in Tabelle 9 dargestellt. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit, soweit bekannt, zum ersten Mal eine größere Kohorte von RA Patienten auf das Vorhandensein von PGRN Ak untersucht. Die Daten dieser Untersuchung, die positive PGRN Ak bei 26.6% (80 von 305) der Patienten mit RA nachweisen, sind somit die ersten Ergebnisse einer repräsentativen, größeren Stichprobe von Patienten mit RA. Einzig Thurner et. al. untersuchten in einer kleinen Studie Patienten mit RA und konnten den PGRN Ak bei 36% (16 von 44) der Patienten nachweisen [55]; der Fokus jener Arbeit lag dabei allerdings nicht auf der RA, sondern auf den Vaskulitiden.

5.3 Progranulin Antikörper und serologischer Status

Autoimmunerkrankungen mit Auftreten von PGRN Ak	Literaturreferenz
Systemischer Lupus Erythematosus	[55]
Klassische Panarteriitis nodosa	[55]
Riesenzell Arteritis	[55]
Granulomatosis mit Polyangiitis (generalisiert)	[55]
Granulomatosis mit Polyangiitis (lokalisiert)	[55]
Churg-Strauss Syndrom	[55]
Psoriasis Arthritis	[57]
Morbus Crohn	[56]
Colitis Ulzerosa	[56]
Rheumatoide Arthritis	[55]

Tabelle 10: Autoimmunerkrankungen mit Nachweis von PGRN Ak in der Literatur

Der PGRN Ak, welcher durch seine Eigenschaft als Autoantikörper sowohl mit dem RF als auch mit dem anti-CCP verglichen werden kann, tritt mit anteilig 26.6% bei einem

vergleichsweise kleinen Prozentsatz der RA-Patienten auf. Der RF, welcher in unserer Studie bei 76.1 % der Patienten detektierbar war (Referenz in der Literatur 75 – 80% [17]) sowie der anti-CCP, welcher in unserer Kohorte in 70.8 % der Fälle nachgewiesen wurde (Referenz in der Literatur 74 - 97% [60]), sind damit deutlich häufiger mit der RA verknüpft. Allerdings zeigt die Analyse des Serostatus (RF und anti-CCP) bezogen auf den PGRN Ak, dass über ein Viertel der Patienten trotz negativer Serologie einen positiven PGRN Ak aufweisen (26.1%, 12 von 46 Probanden). Jene, nach Methoden der klassischen Serologie laborchemisch nicht identifizierbare Patientengruppe offenbart das Potential der PGRN Ak. Wenn die Daten aus unserer Subgruppe seronegativer RA-Patienten (n = 46, davon 12 Ak positiv) repräsentativ wären, zeigten etwa ein Viertel der seronegativen RA-Patienten einen positiven diagnostisch relevanten Seromarker. Eine Validierungskohorte negativer RA-Patienten kann hierbei untersuchen, ob der Test auf PGRN Ak möglicherweise den Anteil der sogenannten „seronegativen“ (RF -, anti-CCP -) RA-Patienten um ca. 25% reduzieren kann.

Turner et. al. überprüften zudem eine gesunde Kontrollgruppe auf PGRN Ak und konnten zeigen, dass der Nachweis bei nur etwa 1% gelang [55]. Dieser Umstand, welcher eine hohe Spezifität vermuten lässt, unterstreicht ebenfalls die Aussagekraft der PGRN Ak.

Der Stellenwert der PGRN Ak Bestimmung bei Patienten mit seronegativer RA scheint gemäß unserer Daten also relevant und sollte in tiefer gehenden und größer angelegten Studien weiter untersucht werden. Beachtet werden sollte allerdings, dass der PGRN Ak nicht als RA spezifisch interpretiert werden darf, sondern wie in Kapitel 5.1 beschrieben auch bei weiteren Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden kann.

5.4 Progranulin Antikörper und Prognose der rheumatoiden Arthritis

Nicht nur eine Aussage in Hinblick auf Diagnosestellung und Serostatus scheint denkbar, auch für die Abschätzung von Prognose und Krankheitsverlauf kann eine Berücksichtigung des PGRN Ak entsprechend der vorliegenden Daten sinnvoll sein.

Verglichen mit der Gesamtverteilung (26.6%) wird deutlich, dass der PGRN Ak in den Subgruppen Larsen ≥ 2 (30%, $p = 0.024$), erosiver Verlauf (28.4%, $p = 0.026$) und positiver IgM RF (28%, $p = 0.001$) überproportional vertreten ist. Auch der DAS28 Score lag in der Gruppe der PGRN Ak-positiven Patienten im Durchschnitt über dem DAS28 Wert der PGRN Ak-negativen Patienten (3.81 vs. 3.5, $p = 0.047$). Die Relation von HAQ, Alter und Beobachtungszeit zeigten in der Auswertung keine statistische Relevanz.

Die Daten dieser Arbeit legen also nahe, dass der PGRN Ak Nachweis mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf assoziiert sein kann. Folglich könnte man der Bestimmung der PGRN AK eine prognostische Bedeutung zusprechen, sollten sich die Ergebnisse in prospektivem Studiendesign reproduzieren lassen.

Um Einflussvariablen auszuschließen, wäre der Vergleich unter anderem zu RF und anti-CCP notwendig, um den PGRN Ak als unabhängigen Risikofaktor zu verifizieren. Der RF, welcher mit dem Auftreten von PGRN Ak assoziiert ist, wurde bereits mehrfach in Zusammenhang mit hoher Krankheitsaktivität und dem gehäuften Auftreten von Erosionen beschrieben (Jansen et. al. [28], Hecht et. al. [25]) und sollte in einer multivariaten Analyse betrachtet werden. Die Relation von PGRN Ak und dem anti-CCP Status unterscheidet sich dahingehend, dass Probanden mit positivem anti-CCP geringfügig weniger häufig (24.8 %, $p = 0.013$) PGRN Ak aufweisen und damit unterproportional vertreten sind. Auch der anti-CCP wird mit einem eher schweren und erosiven Verlauf in Verbindung gebracht (Syversen et. al. [51], Hecht et. al. [25]) und auch hier sollte beleuchtet werden, in wie weit eine Verknüpfung von PGRN und anti-CCP gegeben ist und ob die PGRN Ak als unabhängige Faktoren bestätigt werden können.

Generell scheint der Zusammenhang von PGRN Ak mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf durch die bisher bekannten Modelle nachvollziehbar. Die pathologischen Zusammenhänge von Inflammation und PGRN unterstützen die von uns gemachten klinischen Beobachtungen. Wie von Tang et. al. beschrieben, bindet PGRN sowohl an TNF Rezeptor 1 und -2 (TNFR1 und -2) und inhibiert durch diese Interaktion im Sinne eines kompetitiven Antagonismus die pro-inflammatorischen Einflüsse von TNF α , welche über die gleichen Rezeptoren die vor allem bei der RA entscheidende Wirkung entfalten [53]. Die Ausführungen von Thurner et. al., welche einen geringeren PGRN Spiegel bei PGRN Ak positiven Patienten beschreiben und

aus diesem Grund einen Neutralisationseffekt vermuten, beschreiben in der Folge den hypothetischen, inflammatorischen Einfluss der PGRN Ak [55].

Thurner et. al. beschreiben darüber hinaus das Phänomen der Hyperphosphorylierung von PGRN an Position Ser81, einen Prozess, den die Autoren bisher nur bei PGRN Ak positiven Probanden beobachten konnten und welcher die Interaktion sowohl mit TNFR1, TNFR2 als auch DR3 verhindert und folglich die pro-inflammatorische Wirkung der PGRN Ak zusätzlich verstärkt [54].

Um diesbezüglich weiter aufzuklären, wären weitere und tiefergehende Untersuchungen mit der Betrachtung von PGRN Ak und ihrer Verknüpfung mit schwerem Verlauf (also Erosionen, höheren DAS 28- und HAQ Scores sowie TNF α -Inhibitor Therapieversagen und evtl. viszerale Organmanifestationen) notwendig.

Obwohl einige pathophysiologische Aspekte (s.o.) von PGRN und der entsprechenden Antikörper bereits untersucht wurden, ist eine zugrundeliegende Ursache für das Auftreten der vermutlich zur Erkrankungsentstehung relevanten PGRN Ak nicht hinlänglich bekannt. Da die Autoantikörper unter anderem von Lymphozyten und Chondrozyten sezerniert werden [53], ist ein Zusammenhang mit der RA nachvollziehbar. Aufschlussreich wäre die weitere Exploration der PGRN Ak-Generierung sowohl in Bezug zur RA als auch zu anderen Autoimmunerkrankungen im Tiermodell.

5.5 Progranulin Antikörper und TNF α -Inhibitor Therapieversagen

Während innerhalb der Patientengruppe „TNF α -Inhibitor Therapieversagen“ in 31.2 % der Fälle ein positiver PGRN Ak Status vorliegt, ist letzterer in der Gruppe „TNF α -Inhibitor Therapieansprechen“ in nur 23.1 % der Fälle positiv. Ein positiver PGRN Ak ist in der univariaten Analyse statistisch signifikant ($p = 0.045$) mit dem TNF α -Inhibitor Therapieversagen assoziiert. Die multivariate Auswertung konnte dem PGRN Ak hingegen keinen unabhängigen Wert für eine Assoziation mit TNF α -Inhibitor Therapieversagen bescheinigen, so wie dies beispielsweise für einen erhöhten DAS28-Score oder erosiven Verlauf beschrieben wurde. Gerade in Hinblick auf die relativ geringen Fallzahlen ($n = 32$) in der Gruppe „TNF α -Inhibitor Therapieversagen“ würde die Aussagekraft des PGRN Ak von weitergehenden Studien mit prospektiver

Testung und hohen Fallzahlen an TNF α -Inhibitor-Patienten bis hin zur Evaluation der PGRN Ak als möglichen prognostisch relevanten Serummarker für TNF α -Inhibitor-Ansprechen sicher profitieren. Da eine Untersuchung dieses Zusammenhanges, soweit bekannt, bisher in keiner anderen Arbeit stattgefunden hat, können die vorliegenden Daten in der Literatur nicht verglichen werden. Argumentativ lässt sich die Vergesellschaftung von PGRN Ak Nachweis und TNF α -Inhibitor Therapieversagen allerdings mit den Vermutungen der vorhergehenden Kapitel, nach denen der PGRN Ak durch Abschwächung des anti-inflammatorischen Effekts des PGRN einen Risikofaktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf darstellt, nur eingeschränkt verknüpfen. Eine mögliche Hypothese ist, dass ein schlechteres Ansprechen auf TNF α -Inhibitoren oder eine jeweils höhere erforderliche Dosis von TNF α -Inhibitoren durch die Präsenz von PGRN Ak bedingt wäre, da letztere die PGRN vermittelte Funktion einer natürlichen TNF α Blockade einschränken könnten.

5.6 Weitere Risikofaktoren für ein TNF α -Inhibitor Therapieversagen

Ein TNF α -Inhibitor Therapieversagen war darüber hinaus entsprechend den vorliegenden Daten statistisch signifikant verbunden mit (jeweils univariate Analyse) einer erosiven Gelenkbeteiligung ($p=0.024$), einem DAS 28 ≥ 3.2 ($p=0.036$), positiven RF IgM ($p=0.001$) sowie positiven anti-CCP ($p=0.041$). In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass ein DAS 28 ≥ 3.2 , eine erosive Beteiligung und positive anti-CCP auch unabhängig als statistisch signifikante Parameter häufiger bei TNF α -Inhibitor-Therapieversagen auftreten. Positive RF zeigten in dieser Analyse keine derartige „Risikokonstellation“.

Diese Daten lassen die Interpretation zu, dass ein ungünstiger Krankheitsverlauf, der durch erosiven Verlauf, Serum-anti-CCP und hohe Krankheitsaktivität geprägt ist, mit einem TNF α -Inhibitor-Therapieversagen assoziiert zu sein scheint. Allerdings können die vorliegenden Ergebnisse im Literaturvergleich, welcher sich vorrangig mit dem TNF α -Inhibitor Ansprechen beschäftigt, nicht durchgängig bestätigt werden. Der Vorhersagewert von anti-CCP kann in einer Metaanalyse Lv et. al. [40] nicht bestätigt werden und auch für den RF können weder Lv et. al. [40] noch Hyrich et. al. [27] eine Vorhersagemöglichkeit belegen. Den DAS 28 Score betreffend beschreibt Hyrich et. al. [27] keine vorhandene Korrelation, während Kristensen et. al. den DAS 28 Score in

Bezug auf eine TNF α -Inhibitor-Therapie als invers mit der Remission assoziiert beschreiben [34]. Die jeweiligen Ergebnisse der unterschiedlichen Studien werden in Tabelle 10 zusammengefasst. In Anbetracht der großen Widersprüchlichkeit in der Literatur und aufgrund der Fallzahlen wäre eine größer angelegte Untersuchung dieser Zusammenhänge von ausgeprägtem klinischem Interesse.

Parameter	TNF α -Inhibitor Versagen (+)	TNF α -Inhibitor Ansprechen (-)	Keine Korrelation
RF (+)	*		[40], [27]
Anti-CCP (+)	*, ** ,		[40]
DAS 28 (+)	*, ** ,	[34]	[27]
Erosive Gelenkbeteiligung (+)	*, ** ,		

Tabelle 11: Relevanz von RF, anti-CCP und DAS 28 bezüglich einer TNF α -i Therapie im Literaturvergleich, *= Daten dieser Studie, univariat, **= Daten dieser Studie, multivariat

5.7 Serum-TNF α

Die Bestimmung des Serum-TNF α erfolgte für n = 100 Patienten, dabei wurde bei nur 7% (n = 7) ein erhöhter Spiegel festgestellt. Während in der Gruppe „TNF α -Inhibitor-Therapieversagen“ 100% (n = 2) positives Serum-TNF α aufwiesen, war letzteres in der Gruppe „TNF α -Inhibitor-Therapieansprechen“ in nur 26% der Fälle (n = 4) erhöht. Der PGRN Ak war bei 28.6% (n = 2) der Patienten mit TNF α -Nachweis positiv und bei 22.6% (n = 21) der Patienten ohne TNF α -Nachweis (p=0.4). Hier lässt sich allenfalls eine Tendenz vermuten, denn wie bereits diskutiert sollten in diesem Zusammenhang die geringen Fallzahlen beachtet werden. Diskutabel ist auch die Serum-TNF α Bestimmung mittels ELISA. Trotz Einhalten der Verarbeitungszeiten liegt die HWZ des TNF α mit 20 min in einem empfindlichen Bereich und ist damit fehleranfälliger als die Bestimmung von Substanzen mit längerer HWZ wie PGRN und PGRN Ak.

5.8 Progranulin als Therapieansatz für die rheumatoide Arthritis

Ausgehend von dem von Tang et. al. als auch von Liu et. al. beschriebenen Modell, nachdem PGRN in einer Schlüsselrolle über die TNF Rezeptoren 1 und 2 einen direkten hemmenden Einfluss auf die pro-inflammatorische Wirkung des TNF α ausübt und somit eine anti-inflammatorische Funktion aufweist [39], [53], lässt sich über einen therapeutischen Ansatz nachdenken. Ähnlich wie bei der Therapie mit TNF α -i wäre es denkbar, dass die Hemmung der TNF α Signalkaskade auch durch PGRN möglich ist; anders ausgedrückt könnte PGRN als natürlicher TNF α Blocker agieren. Ein Ansatz dafür wird von Tang et. al. erörtert. In Versuchen mit Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl PGRN als auch ATSTTRIN (ein aus mehreren PGRN Fragmenten zusammengesetztes Molekül) neben einem anti-inflammatorischen Wirkungsprofil auch eine abschwächende Wirkung auf die Arthritis aufweisen [53]. In der gleichen Arbeit wird geschildert, dass ATSTTRIN eine tendenziell stärkere Wirkung zum Ausdruck bringt als PGRN [53]. Bezüglich der Eigenschaften von PGRN und ATSTTRIN beschreiben Liu et. al., dass ATSTTRIN im Gegensatz zu PGRN über keine proonkogene Wirkungskomponente verfügt und damit bessere therapeutische Eigenschaften bietet [39]. Die Interaktion findet nach Liu et. al. zudem nicht wie bei PGRN vornehmlich an TNFR 1 und 2 statt, sondern außerdem an einem weiteren Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie, dem „Death Receptor 3“ (DR3) oder TNFRSF25 [38]. Die Bindung findet auch dort an den cystinreichen Domänen (CRD) statt und inhibiert dosisabhängig den bisher einzig bekannten Liganden für DR3, den „TNF-like ligand 1A“ (TL1A) und die damit verknüpfte Genexpression [38]. Weitere Erkenntnisse bezüglich dieser Ansätze versprechen neuartige Therapiemöglichkeiten und bleiben abzuwarten.

5.9 Ausblick

In dieser Arbeit erfolgte eine erstmals in größerem Umfang durchgeführte Bestimmung von PGRN Ak mit entsprechender, ausführlicher Charakterisierung von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur der Vergleich zu anderen, etablierten Autoantikörpern wie RF oder anti-CCP zulässig ist und Perspektiven bezüglich der laborchemischen Diagnosestellung eröffnen könnte, auch in Hinblick

auf Prognose und Krankheitsverlauf stellt sich der PGRN Ak als vielversprechendes Instrument dar, welches in der vorliegenden Arbeit in erster Annäherung untersucht wurde. Auch die Assoziation von PGRN Ak und einem TNF α -Inhibitor-Therapieversagen konnte anhand einer kleinen Subgruppe hergestellt werden.

Neben tiefergehenden Untersuchungen zur Korrelation von PGRN Ak und Prognose der RA sind weitere Studien zu Ätiologie und Pathogenese ausstehend, um das Verständnis von Funktion und Wirkung zu erforschen und zukünftige Arbeiten effektiv auszurichten.

Ebenfalls wurde in dieser Arbeit die Interaktion weiterer Risikofaktoren sowohl mit den PGRN Ak als auch mit dem Krankheitsverlauf der RA analysiert. Die vorliegenden Ergebnisse haben statistisch signifikante Zusammenhänge hergestellt und Anregungen für weitere Untersuchungen gegeben.

Die Möglichkeit, PGRN und ATSTTRIN als medikamentösen Ansatz für die RA zu verstehen, ist eine weitere interessante Perspektive, über deren Erfolg weitere Studien entscheiden werden.

Es bleibt abzuwarten, inwieweit Tendenzen dieser Arbeit bestätigt werden können und welche Anwendungsmöglichkeiten der PGRN Ak sich in Zukunft etablieren werden. Das Potential dieser Autoantikörper bleibt vielversprechend.

6. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal A (2014) Role of autoantibody testing. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28:907–920
2. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62:2569–2581
3. Assmann G, Shihadeh K, Poeschel V, Murawski N, Conigliarou J, Ong MF, Pfreundschuh M (2014) Prevalence of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): a case-control study. *PLoS One* 9:e88177
4. Auger I, Charpin C, Balandraud N, Martin M, Roudier J (2012) Autoantibodies to PAD4 and BRAF in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 11:801–803
5. Aydin S (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72:4–15
6. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442:916–919
7. Bateman A, Bennett HPJ (2009) The granulin gene family: from cancer to dementia. *Bioessays* 31:1245–1254
8. Berglin E, Dahlqvist SR (2013) Comparison of the 1987 ACR and 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis in clinical practice: a prospective cohort study. *Scand J Rheumatol* 42:362–368
9. Boini S, Guillemin F (2001) Radiographic scoring methods as outcome measures in rheumatoid arthritis: properties and advantages. *Ann Rheum Dis* 60:817–827
10. Bruce B, Fries JF (2003) The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. *Health Qual Life Outcomes* 1:20
11. Cerezo LA, Kuklova M, Hulejova H, Vernerova Z, Kasprikova N, Veigl D, Pavelka K, Vencovsky J, Senolt L (2015) Progranulin Is Associated with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm* 2015:740357
12. Choy E (2012) Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51 Suppl 5:v3-11
13. Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg) (2010) *Innere Medizin*; 6. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München
14. Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D, Dorner T (2010) Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. *Autoimmun Rev* 9:431–435
15. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenbergh R, Dermaut B, Martin J-J, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, Pooter T de, Mattheijssens M, van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, Deyn PP de, Kumar-Singh S, van Broeckhoven C (2006) Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442:920–924
16. Diaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL (2000) Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol* 217:406–418

17. Dietel M, Suttorp N, Zeitz M Harrisons Innere Medizin. Deutsche Ausgabe, 18. Aufl
18. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871–874
19. Fransen J, Stucki G, van Riel PLCM (2003) Rheumatoid arthritis measures. Disease Activity Score (DAS), Disease Activity Score-28 (DAS28), Rapid Assessment of Disease Activity in Rheumatology (RADAR), and Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI). *Arthritis & Rheumatism* 49:S214-S224
20. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR (1980) Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum* 23:137–145
21. G. Assmann, S. Zinke, M. Gerling, N. Fadle, D. Preuss, M. Pfreundschuh, L. Thurner Poster Presentations - Rheumatoid arthritis - prognosis, predictors and outcome: SAT0062 Test for Serum Progranulin Autoantibodies Can Reduce The Seronegative Status in Rheumatoid Arthritis by One Third *Ann Rheum Dis*, 2016;75:Suppl 2, S 686–687
22. Gressner AM, Arndt T (2013) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg
23. He Z, Bateman A (2003) Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)* 81:600–612
24. He Z, Ong CHP, Halper J, Bateman A (2003) Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med* 9:225–229
25. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, Finzel S, Schett G (2015) Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis* 74:2151–2156
26. Hornbeck P (2001) Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol* Chapter 2:Unit 2.1
27. Hyrich KL, Watson KD, Silman AJ, Symmons DPM (2006) Predictors of response to anti-TNF-alpha therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology (Oxford)* 45:1558–1565
28. Jansen LM, van der Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D, Bezemer PD, Dijkmans BA (2001) Predictors of radiographic joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60:924–927
29. Kaneko Y, Kuwana M, Kameda H, Takeuchi T (2011) Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)* 50:1268–1274
30. Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S, Ishikawa E, Kobayashi K (1977) Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *J Biochem* 82:261–266
31. Kay J, Upchurch KS (2012) ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)* 51 Suppl 6:vi5-9
32. Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, Lammermann T, Pfister H, Bateman A, Belaouaj A, Ring J, Ollert M, Fassler R, Jenne DE (2008) Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest* 118:2438–2447
33. Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E (2014) Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 48-49:26–30
34. Kristensen LE, Kapetanovic MC, Gulfe A, Soderlin M, Saxne T, Geborek P (2008) Predictors of response to anti-TNF therapy according to ACR and EULAR criteria

- in patients with established RA: results from the South Swedish Arthritis Treatment Group Register. *Rheumatology (Oxford)* 47:495–499
35. Kuipers JG (Hrsg) (2006) *Medal Rheumatologie. Kriterien für die Klassifikation, Diagnose, Aktivität und Prognose rheumatologischer Erkrankungen*, 1. Aufl. Wis-kom, Friedrichshafen
 36. Lequin RM (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51:2415–2418
 37. LINDSTROM P, WAGER O (1978) IgG Autoantibody to Human Serum Albumin Studied by the ELISA-Technique. *Scand J Immunol* 7:419–425
 38. Liu C, Li X-X, Gao W, Liu W, Liu D-S (2014) Progranulin-derived Atsttrin directly binds to TNFRSF25 (DR3) and inhibits TNF-like ligand 1A (TL1A) activity. *PLoS One* 9:e92743
 39. Liu C-j (2011) Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 585:3675–3680
 40. Lv Q, Yin Y, Li X, Shan G, Wu X, Di Liang, Li Y, Zhang X (2014) The status of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody are not associated with the effect of anti-TNFalpha agent treatment in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *PLoS One* 9:e89442
 41. MacGregor AJ (1995) Classification criteria for rheumatoid arthritis. *Baillière's Clinical Rheumatology* 9:287–304
 42. McInnes IB, Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205–2219
 43. NIENHUIS RL, MANDEMA E (1964) A NEW SERUM FACTOR IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS; THE ANTIPERINUCLEAR FACTOR. *Ann Rheum Dis* 23:302–305
 44. Niewold TB, Harrison MJ, Paget SA (2007) Anti-CCP antibody testing as a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *QJM* 100:193–201
 45. Ramey DR, Raynauld JP, Fries JF (1992) The health assessment questionnaire 1992: status and review. *Arthritis Care Res* 5:119–129
 46. Schellekens GA, Visser H, Jong BA de, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43:155–163
 47. Schottelius AJG, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK3 (2004) Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 13:193–222
 48. Sheldon J (2004) Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18:249–269
 49. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GMC, Drijfhout JW, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA (2014) Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev* 13:225–230
 50. Steiner G, Smolen J (2002) Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res* 4 Suppl 2:S1-5
 51. Syversen SW, Goll GL, van der Heijde D, Landewe R, Lie BA, Odegard S, Uhlig T, Gaarder PI, Kvien TK (2010) Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study. *Ann Rheum Dis* 69:345–351
 52. Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, Szanto S, Szucs G, Szekanecz Z (2010) Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 9:140–143

53. Tang W, Lu Y, Tian Q-Y, Zhang Y, Guo F-J, Liu G-Y, Syed NM, Lai Y, Lin EA, Kong L, Su J, Yin F, Ding A-H, Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Tao J, Craft J, Yin Z, Feng JQ, Abramson SB, Yu X-P, Liu C-j (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* 332:478–484
54. Thurner L, Fadle N, Regitz E, Kemele M, Klemm P, Zaks M, Stoger E, Bette B, Carbon G, Zimmer V, Assmann G, Murawski N, Kubuschok B, Held G, Preuss K-D, Pfreundschuh M (2015) The molecular basis for development of proinflammatory autoantibodies to progranulin. *J Autoimmun* 61:17–28
55. Thurner L, Preuss K-D, Fadle N, Regitz E, Klemm P, Zaks M, Kemele M, Hasenfus A, Csernok E, Gross WL, Pasquali J-L, Martin T, Bohle RM, Pfreundschuh M (2013) Progranulin antibodies in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 42:29–38
56. Thurner L, Stoger E, Fadle N, Klemm P, Regitz E, Kemele M, Bette B, Held G, Dauer M, Lammert F, Preuss K-D, Zimmer V, Pfreundschuh M (2014) Proinflammatory progranulin antibodies in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 59:1733–1742
57. Thurner L, Zaks M, Preuss K-D, Fadle N, Regitz E, Ong MF, Pfreundschuh M, Assmann G (2013) Progranulin antibodies entertain a proinflammatory environment in a subgroup of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 15:R211
58. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HPJ, Bateman A (2011) Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. *J Mol Neurosci* 45:538–548
59. Trouw LA, Mahler M (2012) Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 12:318–322
60. Vossenaar ER, Smeets TJM, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP (2004) The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 50:3485–3494
61. Waaler E (2007) On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS* 115:422–38; discussion 439
62. Wells G, Becker J-C, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, Aletaha D, van Riel PLCM (2009) Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann Rheum Dis* 68:954–960
63. YALOW RS, BERSON SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39:1157–1175
64. Yamamoto Y, Takemura M, Serrero G, Hayashi J, Yue B, Tsuboi A, Kubo H, Mitsuhashi T, Mannami K, Sato M, Matsunami H, Matuo Y, Saito K (2014) Increased serum GP88 (Progranulin) concentrations in rheumatoid arthritis. *Inflammation* 37:1806–1813
65. Yorde DE, Sasse EA, Wang TY, Hussa RO, Garancis JC (1976) Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. *Clin Chem* 22:1372–1377

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh, Direktor der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, und Prof. Dr. med. Gunter Aßmann, geschäftsführender Oberarzt der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit bedanken. Vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Gunther Aßmann gilt ein großer Dank für die umfassende Unterstützung während des gesamten Arbeitsprozesses. Vielen Dank für die vielen Rückmeldungen, Denkanstöße und die Beratung in allen Fragen zur Dissertation.

Ein großer Dank gilt auch dem gesamten Team des José-Carreras-Zentrum für Immun- und Gentherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes, insbesondere Frau Natalie Fadle und Herrn Dieter Preuss und für die Unterstützung und Hilfestellung besonders beim experimentellen Teil dieser Arbeit. Auch Herr Dr. Lorenz Thurner hat mich durch seine Arbeit inspiriert und stand mir bei Fragen zur Seite.

Im Weiteren möchte ich mich sehr bei Frau Dr.dipl.-math. Mei Fang Ong und Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil für Beratung und Betreuung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Vielen Dank auch meiner Familie und Freunden für die persönliche Unterstützung während dieser interessanten Zeit.

8. Publikationen

Poster Presentations - Rheumatoid arthritis - prognosis, predictors and outcomeSAT0062 Test for Serum Progranulin Autoantibodies Can Reduce The Seronegative Status in Rheumatoid Arthritis by One Third

G. Assmann, S. Zinke, M. Gerling, N. Fadle, D. Preuss, M. Pfreundschuh, L. Thurner, Ann Rheum Dis 2016;**75**:Suppl 2 686-687

Poster Presentations - Rheumatoid arthritis - prognosis, predictors and outcomeTHU0098 Serum Progranulin Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Associated with Higher Disease Activity

G. Assmann, S. Zinke, M. Gerling, M. Ong, N. Fadle, K.D. Preuss, L. Thurner, M. Pfreundschuh, Ann Rheum Dis 2015;**74**:Suppl 2 228

EULAR 2014: Scientific Abstracts - Abstracts accepted for publication. Cytokines and inflammatory mediatorsAB0064 Progranulin Antibodies (PGRN-ABS) in Rheumatoid Arthritis More Frequent than in Psoriatic Arthritis

G. Assmann, S. Zinke, M. Gerling, M. Pfreundschuh, L. Thurner, K. Preuss, Ann Rheum Dis 2014;**73**:Suppl 2 825

Serum progranulin antibodies in RA patients associated with severe course of disease

Assmann, Gunter; Zinke, Silke; Gerling, Moritz; Preuss, Klaus-Dieter; Thurner, Lorenz; Pfreundschuh, Michael, 42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (2014)